

TRATAMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO COM LIPOSSOMOS
CONTENDO FOSFATIDILSERINA

FERNANDA SOARES DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES
DEZEMBRO-2021

TRATAMENTO COM LIPOSSOMOS CONTENDO FOSFATIDILSERINA EM
MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO

FERNANDA SOARES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para a obtenção do
título de mestre em biociências e
biotecnologia”

Orientador: Prof. João Luiz Mendes Wanderley

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
DEZEMBRO- 2021

TRATAMENTO COM LIPOSSOMOS CONTENDO FOSFATIDILSERINA EM
MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO

FERNANDA SOARES DOS SANTOS

Dissertação apresentado ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Biociência.

Examinada em 13 de dezembro de 2021

Banca examinadora

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley

Instituição: UFRJ Assinatura: _____

Prof^a Dr^a. Profa. Anna Lvovna Okorokova Façanha

Instituição: UENF Assinatura _____

Prof^a. Dr^a. Suzana Passos Chaves

Instituição: UFRJ Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Sheila Espírito Santo Araújo

Instituição: UENF Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por toda a força que me deu para conseguir enfrentar as dificuldades ao longo da minha caminhada, e por me ajudar a vencer cada desafio, e a aceitar que muitas coisas não sairiam conforme a minha vontade.

Agradeço a minha família por estar sempre do meu lado me apoiando e ouvindo. E em especial ao meu pai que sempre vibrou e torceu pela minha formação, mas que infelizmente o câncer levou durante o meu mestrado. Sei que onde ele estiver com certeza estará feliz por mais uma conquista acadêmica minha.

Agradeço ao melhor amigo e irmão Serginho, que apesar de ter apenas 9 anos, foi a pessoa que mais me apoiou e me disse que tudo daria certo.

Agradeço ao meu orientador João Wanderley, pelo projeto, por ter confiado ele a mim. Sei que tivemos dificuldades ao longo do mestrado, mas apesar de tudo sempre houve confiança de ambas as partes. Agradeço a ele também, pela paciência que precisou ter em muitos momentos. Agradeço por ter me apresentado o universo da Imunologia no qual eu me encontrei. Obrigada por ter compartilhado isso comigo me fez dar um sentido maior a minha profissão, saber exatamente onde eu quero estar. Obrigada por ter sido um pai rígido em momentos que precisou ser, e por ter sido um orientador em outros momentos que também sei que precisou ser.

Agradeço ao coordenador da Pós-Graduação, professor Arnaldo Peçanha por ter estado do meu lado quando mais precisei durante o meu mestrado, por ter me ouvido, por ter me aconselhado, por ter me acolhido e me feito sentir segura como aluna. Um dia quero ser metade da pessoa que você é professor.

Agradeço ao professor Renato DaMatta também por ter me acolhido em seu laboratório, por ter me aconselhado diversas vezes enquanto estava em seu laboratório. Obrigada por sempre ter boa vontade em me ajudar, seja com reagentes para experimentos.

Agradeço as minhas irmãs acadêmicas Arieli Portugal e Franciane Alves por estarem sempre do meu lado desde o início, sempre me ajudaram com questões pessoais, e com científicas. E hoje terminando o mestrado só posso dizer que tive as melhores amigas do meu lado. Obrigada por se fazerem tão presentes na minha formação.

Agradeço aos meus amigos que colaboraram com o meu mestrado, Evelyn Dalila e Isabela Souza por terem me ajudado com o experimento de Von Frey. Eu quis muito fazer esse experimento e se não fosse pela ajuda de vocês eu provavelmente não teria conseguido. Agradeço ao meu amigo Hassan Jerdy pela colaboração com a histotécnica que fez muita diferença nos resultados da minha pesquisa. Agradeço a Amanda Amorim que entrou a pouco tempo no laboratório, mas me ajudou muito no último experimento.

Agradeço aos professores do laboratório Celso Belmiro e Suzana Chaves por terem sempre me ajudado com as dúvidas de Imunologia durante a minha permanência no laboratório, vocês me ensinaram ainda mais sobre a Imunologia e agradeço muito por terem contribuído com meu aprendizado.

Agradeço ao grupo de estudos NEBBIO no qual fiz parte, por terem me acolhido na UENF, fizeram minha permanência no campus ter um sentido ainda maior do que apenas a minha pesquisa, mas também em acreditar no programa no qual faço parte.

Agradeço o CNPq por minha bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	4
1-JUSTIFICATIVA	Erro! Indicador não definido.
2-INTRODUÇÃO	7
3-OBJETIVOS	14
Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
4-METAS	25
5-METODOLOGIA PROPOSTA.....	25
5.1 Animais.....	25
5.2 Artrite induzida por colágeno e avaliação clínica da doença	26
5.3 Tratamento com nanopartículas contendo PS.....	26
5.4 Dosagem de citocinas séricas	30
5.5 Análise histopatológica	30
6- RESULTADOS ESPERADOS.....	31
7- BIBLIOGRAFIA	43

Lista de abreviaturas

AIC- Artrite induzida por colágeno
APC- células apresentadoras de antígeno
AR- Artrite Reumatoide
CRP- proteína c reativa
CTLA4-Ig- antígeno de linfócito T citotóxico 4-imunoglobulina
EAE- encéfalo autoimune experimental
ECM- matriz extracelular
SM- Esfingomielina
FR- Fator reumatoide
SSF-sinoviócitos semelhantes a fibroblastos
GCs- Glicocorticoides
GM-CSF- Fator estimulador de macrófagos
IL- Interleucina
JAKs- Janus Quinase
LS- Líquido sinovial
MHC- complexo principal de histocompatibilidade
MMPs- metaloproteinase de matriz
NMSCs - câncer de pele não melanoma
PADS- peptidil arginina deaminase
PC- Fosfatidilcolina
PG- Prostaglandinas
RTKS- receptores de tirosina quinase
SM - Esfingomielina
STAT- transdutor de sinal e ativador de ???
T1D- diabetes tipo-1 autoimune
TGF- β - fator de crescimento transformador β
TIMPs- inibidores de tecido de MMPs
Treg- células T reguladoras

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1- Fatores que contribuem para o desenvolvimento da AR
- Figura 2- Fase pré-clínica
- Figura 3- Patogênese da AR
- Figura 4- FLS exerce funções que mantêm a patogênese da AR
- Figura 5: Diferenciação de osteoclastos induzido por citocinas
- Figura 6: Papel da IL-17 na AR
- Figura 7- Estratégias de tratamento para AR
- Figura 8- Semelhanças e diferenças entre AR e (AIC) em camundongos e ratos
- Figura 9- Diferentes cepas de camundongos são suscetíveis a artrite com peptídeos de colágenos específicos
- Figura 10 - Receptores TAM
- Figura 11- A fagocitose de células apoptóticas promove a homeostase.
- Figura 12- Linha de tempo de indução e tratamento da AIC
- Figura 13- Acompanhamento clínico dos animais com AIC
- Figura 14- Teste de mobilidade
- Figura 15- Teste da placa quente
- Figura 16- Teste de Von Frey
- Figura 17- Manifestação clínica dos camundongos com AIC
- Figura 18- Avaliação Peso.
- Figura 19- Avaliação do teste de mobilidade.
- Figura 20- Teste de placa quente
- Figura 21- Teste de Von Frey manual
- Figura 22- Nível de citocinas séricas
- Figura 23- Histopatologia das articulações de camundongos com AIC
- Figura 24- Análise das alterações histológicas da pata de camundongos da cepa DBA/1 no modelo de AIC

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica caracterizada por um infiltrado celular sinovial que lesiona a cartilagem, o tecido ósseo e a articulação.

Linfócitos autorreativos específicos contra antígenos sinoviais liberam citocinas pró-inflamatórias que promovem o recrutamento e ativação das células que irão desencadear os danos teciduais. Durante a morte celular por apoptose, fosfatidilserina (PS) é exposta na superfície celular e reconhecida por células fagocíticas promovendo a endocitose e a liberação de citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras. Dessa forma, testamos se lipossomos contendo PS na superfície são capazes de modular a resposta inflamatória e manifestações clínicas no modelo de artrite induzida por colágeno (AIC), pois é o que mais se assemelha a AR em humanos. Animais tratados apresentaram aumento na capacidade motora com consequente diminuição da perda de peso. Estes resultados se relacionam com a diminuição da nocicepção mecânica, indicando menos sensibilidade a dor nestes animais. Além disso, observamos que o tratamento levou à diminuição do infiltrado inflamatório sinovial, levando a proteção da estrutura das articulações com a diminuição do *pannus*, tecido inflamatório fibroso que substitui a cartilagem e tecido ósseo. A diminuição dos níveis séricos de $TNF\alpha$ nos animais tratados, mas não de IL-17, reforça que o tratamento tem efeito na resposta inflamatória associada à doença. Estes resultados sugerem que lipossomos contendo fosfatidilserina podem ser utilizados em um contexto inflamatório autoimune, melhorando alguns dos sintomas apresentados.

Palavras-chave: Autoimunidade; inflamação; terapia imunológica.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by a synovial cell infiltrate that damages cartilage, bone tissue and joints. Specific autoreactive lymphocytes against synovial antigens release pro-inflammatory cytokines that promote the recruitment and activation of cells that will trigger tissue damage. During cell death by apoptosis, phosphatidylserine (PS) is exposed on the cell surface and recognized by phagocytic cells, promoting endocytosis and the release of anti-inflammatory and immunosuppressive cytokines. Thus, we tested whether liposomes containing PS on the surface can modulate the inflammatory response and clinical manifestations in the collagen-induced arthritis (ICA) model, as it is the one that most resembles RA in humans. Treated animals showed an increase in motor capacity with a consequent decrease in weight loss. These results are related to the decrease in mechanical nociception, indicating less sensitivity to pain in these animals. Furthermore, we observed that the treatment led to a reduction in the synovial inflammatory infiltrate, leading to the protection of the joint structure with a reduction in the pannus, a fibrous inflammatory tissue that replaces cartilage and bone tissue. The decrease in serum $\text{TNF}\alpha$ levels in treated animals, but not IL-17, reinforces that the treatment influences the inflammatory response associated with the disease. These results suggest that liposomes containing phosphatidylserine can be used in an autoimmune inflammatory context, improving some of the symptoms presented.

Keywords: Autoimmunity; inflammation; immunological therapy.

1- Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória caracterizada pela desordem e disfunção do equilíbrio homeostático do sistema imune. Na AR ocorre a produção e a infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial das articulações que pode ocasionar dano tecidual e perda de função. Este infiltrado inflamatório é formado devido a ativação de linfócitos específicos contra antígenos sinoviais. AR possui uma incidência de 0,5 a 1% da população mundial e sua incidência é maior em mulheres do que em homens (LIU; XIAO, 2020). O estabelecimento e o avanço dessa doença estão relacionados à fatores genéticos e ao estilo de vida impactando a imunopatogênese. O principal fator genético predisponente são alelos presentes no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe 2. Entre os pacientes com AR, 70% destes possuem o alelo HLA-DR4, sendo este, um conhecido fator de suscetibilidade (FIRESTEIN; MCINNES, 2017). Entre os fatores de riscos ambientais associados ao estilo de vida destaca-se tabagismo, obesidade, falta de atividades físicas, exposições a agentes virais recorrentes, além disso a microbiota intestinal pode estar associada a patogênese da AR, assim como o microbiota oral que causa periodontite (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Modelos experimentais são cruciais para a investigação científica da AR, pois permitem avaliar a imunopatogênese e novas estratégias terapêuticas. O modelo de artrite induzida por colágeno tipo 2 (AIC) em camundongos da linhagem DBA/1 é o que mais esse assemelha a AR, pois as manifestações clínicas e características imunohistopatológicas articulares são semelhantes (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

Pela a AR ser caracterizada pelo descontrole do sistema imune, gerando uma resposta inflamatória exacerbada contra antígenos articulares, os fármacos utilizados atualmente para controlar a doença possuem a função de suprimir ou modular o sistema imune. Os medicamentos mais utilizados são as drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDS); denominação utilizada para um conjunto de medicamentos como imunossupressores, quimioterápicos e imunomoduladores (BLAIR; DEEKS, 2017). Apesar dessas drogas diminuírem o inchaço, dor e erosão óssea, podem causar efeitos colaterais graves como infarto no miocárdio e imunodeficiências. Estes efeitos são agravados pelo esquema de tratamento que muitas vezes necessita de doses altas por longos períodos de tempo, de acordo com

a gravidade das manifestações clínicas apresentadas (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

A inflamação, e conseqüentemente o dano tecidual na articulação, tornam a dor uma característica predominante da AR. A dor é conhecida pelo termo de nocicepção, que se refere ao estímulo sensorial (Martin et al, 2018). Esse estímulo é reconhecido pelos nociceptores que se encontram na pele. Nociceptores são neurônios sensoriais primários que são ativados por estímulos capazes de causar danos nos tecidos. Esses estímulos podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou produtos químicos (Julios et al, 2001). Assim que ativados por esses estímulos, os nociceptores transmitem informações através da fibra eferente primária até sistema nervoso central, onde a informação é interpretada em forma de dor.

A dor inflamatória acontece pela ativação dos nociceptores, que desencadeiam a vasodilatação e aumento de prostaglandinas e citocinas inflamatórias. E como a dor, é uma característica predominante na AR, conseguir controlar a dor através do controle da exacerbação de citocinas inflamatórias é uma estratégia importante, pois melhoraria a qualidade de vida de pacientes com AR (Julios et al, 2001).

A fostatidilserina (PS) é um fosfolípido envolvido na manutenção da tolerância periférica imunológica, pois, quando reconhecida por fagócitos, ativa a secreção de citocinas imunorreguladoras e anti-inflamatórias (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002). Isto é particularmente importante pois PS é exposta na superfície de células em estágios iniciais de apoptose, hemácias senescentes e em outras situações de estresse celular (SEGAWA; NAGATA, 2015). Dessa forma PS, participa não só do reconhecimento e remoção dessas células por fagócitos, mas impede que ocorra uma resposta imunológica durante esse processo, fazendo com que os antígenos sejam apresentados em um contexto tolerogênico (RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2018). Esta propriedade da PS tem sido avaliada como forma de terapia em doenças inflamatórias de origem autoimune como Lúpus e diabete tipo 1 (PUJOL-AUTONELL et al., 2015).

Portanto, o estudo das propriedades da PS no contexto da AR, utilizando um modelo experimental confiável e que espelhe as características imunopatológicas vistas em humanos, como a AIC, é justificável. Além de permitir entender melhor os fatores imunológicos envolvidos no desenvolvimento do dano tecidual, pode contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica baseada na modulação do

sistema imune de forma semelhante aos processos fisiológicos associados a este fosfolípido.

2- Revisão Bibliográfica

Artrite Reumatoide

Os fatores ambientais, genéticos e o estilo de vida da pessoa estão relacionados com a etiologia das doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatoide (AR) (WEISSMANN, 2006). A AR é uma doença inflamatória crônica, sistêmica e progressiva que é iniciada pela ativação de células T que causam a destruição das articulações (WEISSMANN, 2006). AR é uma doença caracterizada por episódios de inflamação aguda devido ao aumento de leucócitos, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos T e B nas articulações (HAIKAL et al., 2019).

AR afeta entre 0,5 e 1% de toda a população mundial. A patogênese da doença não é completamente entendida, porém sabe-se que fatores genéticos estão envolvidos com o desenvolvimento da doença. Entre esses fatores de risco de desenvolver a AR se destaca o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que em humanos é denominado antígeno leucocitário humano (HLA). O HLA DR β 1 com sequência de aminoácidos QKRAA, QRRAA, ou RRRAA nas posições 70–74 está associado com o desenvolvimento da doença (BAX et al., 2011). AR envolve a produção de auto anticorpos, fator reumatoide (FR) e anticorpo anti-peptídeos citrulinados (ACPA) que resultam na destruição tecidual (Fig1) (BOISSIER et al., 2012). Na AR ocorre a produção de diversas citocinas que atuam em paralelo, e possuem ações sistêmicas e locais que aumentam ainda mais o infiltrado celular na membrana sinovial, devido a ação exacerbada do aumento de mediadores inflamatórios (BOISSIER, 2011).

A fase pré-clínica da doença, é conhecida como na qual ocorre a quebra da tolerância imunológica e são produzidos ACPAs e FR (DERKSEN; HUIZINGA; VAN DER WOUDE, 2017). A quebra da tolerância pode acontecer uma década antes da sinovite AR clinicamente evidente, mas é uma fase importante para diagnóstico precoce em humanos através da observação laboratorial dos auto anticorpos citados (SOKOLOVE et al., 2012). Embora auto anticorpos nem sempre ocorram em todos os pacientes com AR, sua presença indica o desenvolvimento da doença, e a sua produção está relacionada com a quebra da tolerância imunológica, além da gravidade da AR (SHIM; STAVRE; GRAVALLESE, 2018). Nesta fase existem alguns

fatores ambientais que estão envolvidos com o início da doença, como tabagismo, que compromete alterações de pós-tradução de proteínas, como por exemplo a citrulinização, importante no desenvolvimento da artrite. Também foi demonstrado que a microbiota está envolvida com a produção de auto anticorpos tendo participação no desenvolvimento de patologias associadas a inflamações crônicas (ZECHNER, 2017). Além disso, a bactéria *Porphyromonas gingivalis* envolvida na periodontite também induzem o processo de citrulinização de proteínas (WEGNER N et al., 2011).

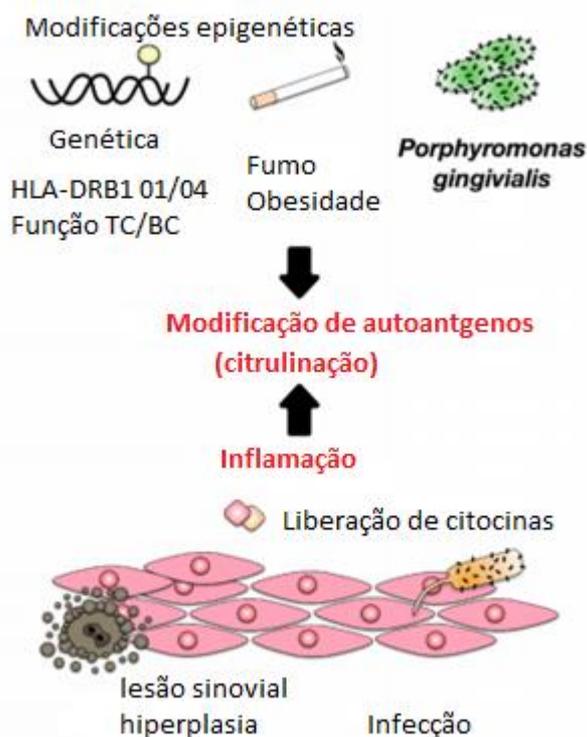


Figura 1- Fatores que contribuem para o desenvolvimento da Artrite Reumatoide
Fatores como genética, fumo de cigarro, obesidade e infecções por *Porphyromonas gingivalis* influenciam a produção de auto antígenos e citocinas que contribuem para o desenvolvimento da AR que (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020)

A citrulinização é realizada por enzimas chamadas de peptidil arginina deaminases (PADS) que metabolizam o aminoácido arginina em citrulina. Fatores comportamentais como tabagismo e casuísitocos, como infecção por bactéria *P. gingivalis* induzem a citrulinização de proteínas. Entre os pacientes com AR, 70% deles apresentam perda de tolerância para proteínas citrulinadas apresentando ACPAs (HARRE et al., 2012).

A citrulina é uma pós tradução de proteínas chamadas de peptidilarginina deaminases (PAD), que convertem aminoácidos arginina em que contribui para a formação de imunocomplexos que podem se depositar na sinóvia, e assim ativam

respostas inflamatórias como a ativação do sistema complemento, a produção e ativação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células (Figura 2) (SHIM; STAVRE; GRAVALLESE, 2018). O macrófago expressa em sua membrana plasmática a proteína regulada por glicose citrulinada 78 (GRP78). As ACPAs interagem com o macrófago pela ligação com essa proteína induzindo fatores de transcrição que produzem $TNF-\alpha$, citocina que também promove a expansão de precursores de osteoclastos e sua diferenciação. As ACPAs também podem ativar diretamente osteoclastos, pois essa célula possui o receptor $Fc\gamma R$ que permite que as ACPAs promovam a diferenciação de osteoclastos, mediando aumento de perda óssea (SHIM; STAVRE; GRAVALLESE, 2018)). Além disso, a ativação exacerbada das citocinas que contribuem para a patologia da doença, e do HLA os linfócitos T induzem uma resposta auto reativa que coopera também com a patologia da AR.

O infiltrado inflamatório na sinóvia é composto por monócitos/macrófagos, células NK, linfócitos B, e linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. No entanto, especialmente os linfócitos T direcionam o acúmulo de mais citocinas no ambiente inflamado (MELLADO et al., 2015). Todo esse acúmulo de células inflamatórias associado com altos níveis de citocinas aumentam a diferenciação de células osteoclásticas e diminuição da diferenciação de células osteoblásticas o que resulta em um em desequilíbrio maior de absorção óssea comparado a reabsorção (MCINNES; SCHETT, 2011). As células como osteoclastos e linfócitos T autorreativos destroem a cartilagem e posteriormente o tecido ósseo comprometendo funcionalmente a articulação.

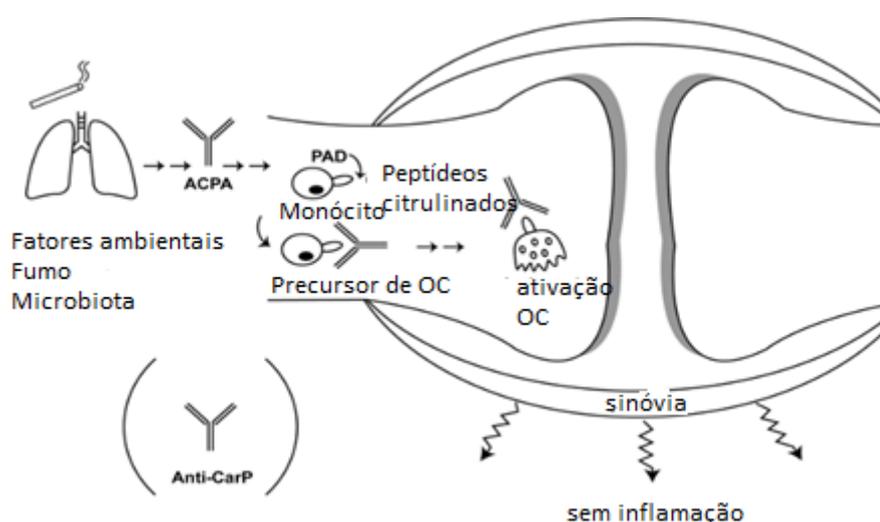


Figura 2- Fase pré-clínica da Artrite Reumatoide. Fatores ambientais influenciam a formação de anticorpo anti-peptídeos citrulinados que induzem a diferenciação de

monócitos ativando de osteoclastos (OC), células que direcionam a destruição tecidual na sinóvia. Esse processo resulta na artralgia que ocorre antes da artrite ser estabelecida (SHIM; STAVRE; GRAVALLESE, 2018).

A membrana sinovial é constituída predominante por sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF) que representam aproximadamente 75 a 80% destas células. SSF também são conhecidas como fibroblastos sinoviais ou sinoviócitos do tipo B. Estas células além de formarem o revestimento sinovial também possuem a função de produzirem o líquido sinovial (LS) (BUSTAMANTE et al., 2017).

SSF são responsáveis em garantir a integridade estrutural e dinâmica das articulações controlando a composição do LS e da matriz extracelular (MEC). Na AR os SSF são modulados por estímulos inflamatórios da imunidade adaptativa e inata agravando ainda mais a doença. SSF são caracterizados por expressarem moléculas de adesão como a caderina-11 que também é expressa por osteoblastos. Entre as funções que a caderina-11 exerce, destaca-se sua capacidade de manter a integridade da membrana sinovial além de regular a secreção de IL-6 e outras propriedades inflamatórias (DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO, 2011).

Durante o processo inflamatório que acontece na AR, ocorre o aumento do infiltrado celular na membrana sinovial que é chamado de *pannus*, tecido formado pelo acúmulo de células inflamatórias e variadas fibras, considerado um tecido de cicatrização (Figura 3). A invasão da cartilagem pelo *pannus* leva a destruição do tecido normal cartilagenoso e posteriormente o tecido ósseo (KOMATSU; TAKAYANAGI, 2012). As células inflamatórias liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF α , IL-17 e GM-CSF. Com isso ocorre exacerbação da inflamação, pois são recrutadas mais células para o local da inflamação (SHAN et al., 2019). Além disso, a IL-17 promove a produção de VEGF e a formação de novos vasos no tecido inflamado possibilitando que a doença progrida, pois mantém os recursos necessários para manter a atividade das células em funcionamento e promove aumento do infiltrado celular (KONISTI; KIRIAKIDIS; PALEOLOG, 2013).

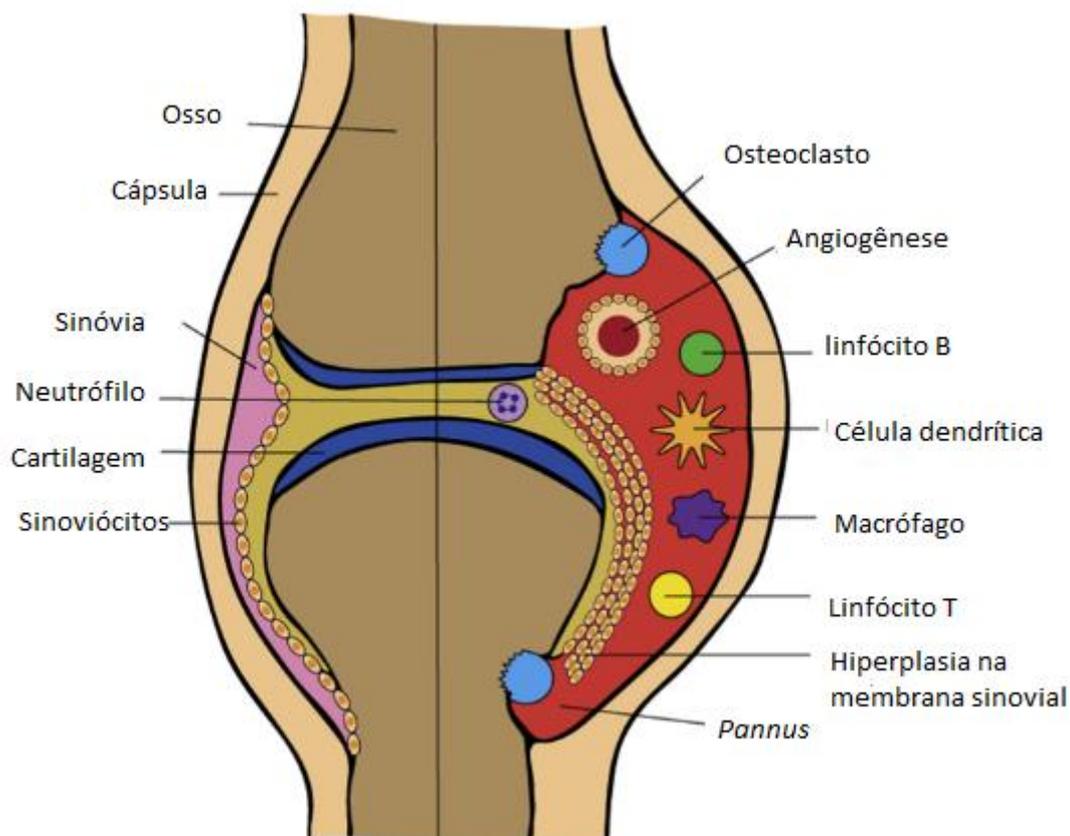


Figura 3- Patogênese da AR, formação de *pannus* e inflamação sistêmica. A formação do *pannus* é composta pelo acúmulo de células na sinóvia que geralmente são linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, aumento de citocinas e formação de angiogênese (LITTLEJOHN; MONRAD, 2018).

O *pannus* reumatoide é caracterizado pelo excesso de SSF, devido ao desequilíbrio entre a proliferação e a resistência ao processo apoptótico mesmo em um ambiente com altos níveis de mediadores que induzem morte celular, como espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e citocinas. Estas células sobrevivem a indução de apoptose e favorecem a formação do *pannus*, pois controlam a composição da MEC e do LS, secretando enzimas que são capazes de destruir sua membrana plasmática. Entre essas enzimas destacam-se a metaloproteinase de matriz (MMPs) e os inibidores de enzimas degradantes de matriz como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). Os SSF também promovem a erosão óssea devido a sua capacidade de secretar o ligante ativador do receptor do fator- κ B (receptor ativador do NF- κ B (RANK) que promove a diferenciação dos osteoclastos (DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO, 2011).

A terceira característica importante das SSF em AR é a sua capacidade de secretar mediadores inflamatórios como IL-18 e IL-1 β , fatores pró angiogênicos,

quimiocinas como a CCL2 ou proteína quimioatrativa de monócitos e VEGF (Figura 4) (fatores de crescimento endotelial vascular). O efeito de todos esses fatores promove a inflamação na articulação e recruta mais células inflamatórias para a sinóvia (DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO, 2011).

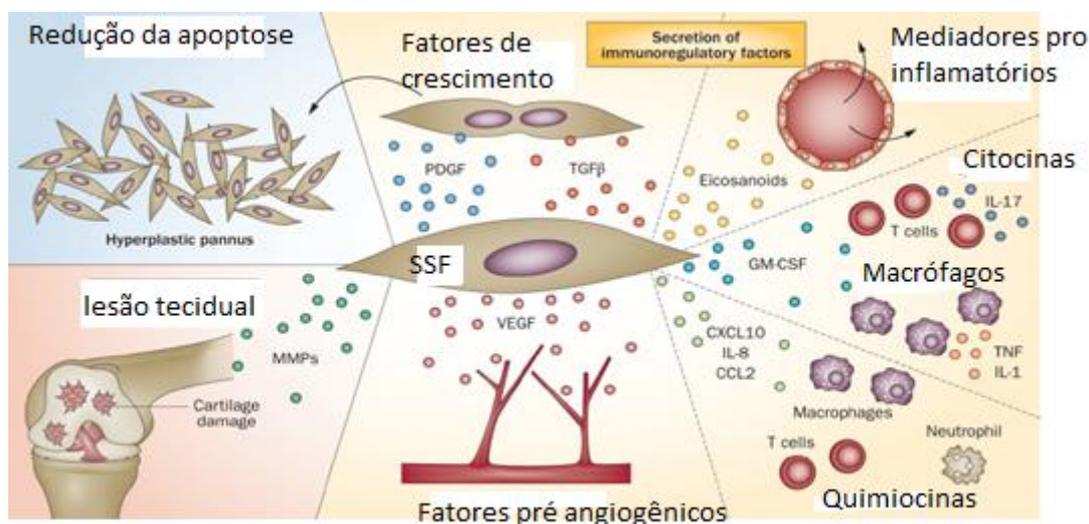


Figura 4- Sinoviócitos Semelhantes Fibroblastos exerce funções que mantêm a patogênese da AR. Como a resistência da célula a entrar em apoptose, secreção de fatores de crescimento, aumento de mediadores pro-inflamatórios, fatores que contribuem para a angiogênese. Esse conjunto de fatores contribuem para a destruição tecidual (DIANE E. HANDY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO, 2011).

Como já foi dito, as SSF ativadas secretam citocinas que ativam a migração de monócitos que são células precursoras dos osteoclastos. Além disso, ocorre uma expansão de linfócitos T e células sinoviais antes da observação de absorção óssea, o que sugere que essas células podem estar envolvidas na perda óssea. Os dois principais fatores envolvidos na formação dos osteoclastos são o RANK-L e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) que são liberados, na forma solúvel, pelo linfócito T. Além disso, citocinas liberadas pelos linfócitos, como a IL-17, atuam de forma independente de RANKL ativando os osteoclastos. Outra forma de ativação de osteoclastos é pela ação em conjunta de $TNF\alpha$ e RANK-L (Figura 5). Além da capacidade dos linfócitos T de apoiarem a osteoclastogênese diretamente, secretam citocinas como IL-1, IL-6 e IL-17 que estimulam a expressão de RANKL por osteoclastos e fibroblastos permitindo a osteoclastogênese dependente de contato (GILLESPIE, 2007).

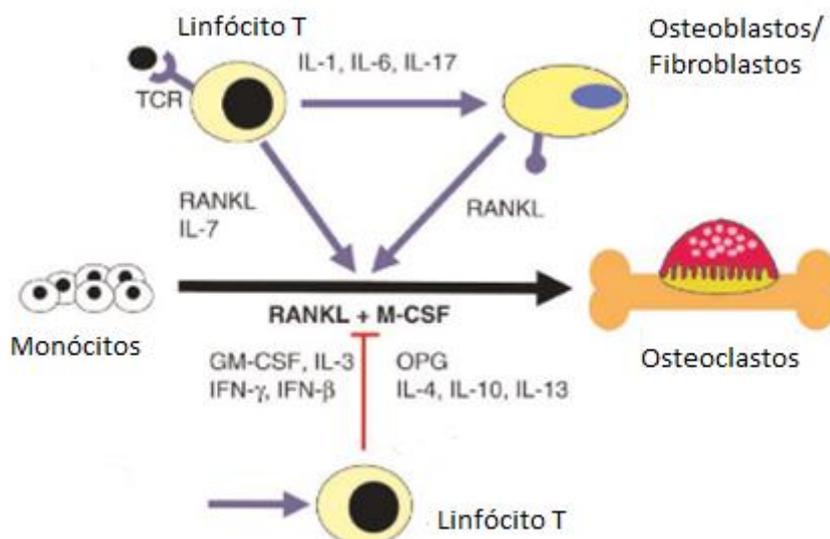


Figura 5- Diferenciação de osteoclastos induzido por citocinas. A diferenciação de osteoclastos é estimulada principalmente pelas citocinas RANKL e M-CSF. Em uma resposta inflamatória artrigênica linfócitos produtores de IL-1, IL-6 e IL17, normalmente Th17 ativados por antígenos articulares, são capazes de estimular osteoblastos e SSF a produzirem RANKL. Além disso, estes linfócitos podem produzir RANKL diretamente. Estes dois processos facilitam a erosão óssea (GILLESPIE, 2007).

IL-17 na AR

A principal célula envolvida com a patogênese da AR é o linfócito Th17, produtor de citocinas como IL-17, IL-6 e IL-23 (PECK; MELLINS, 2009). Ao que se sabe, o linfócito Th17 não inicia a inflamação na AR, porém a auxilia e a potencializa. Na AR a sinóvia é caracterizada por níveis elevados de IL-6, TNF- α , IL-1, óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2), e o linfócito Th17 é responsável por manter esses fatores pró-inflamatórios além de mediar a indução de outras citocinas como a IL-6 e IL-8. Estas citocinas estão associadas à inflamação no líquido sinovial e ativam os sinoviócitos, SSF, que como já foi dito também exacerbam ainda mais a inflamação, pois possuem funções que direcionam ao dano tecidual (PECK; MELLINS, 2009).

A IL-17 é uma das principais citocinas relacionadas com a patogênese da AR, pois ela intensifica a inflamação promovendo angiogênese através do aumento da produção de VEGF em SSF (CELLS et al., 2004). A angiogênese induzida por IL-17 ativa o recrutamento de células como neutrófilos, monócitos e linfócitos T para a articulação (OTTONELLO et al., 2002). A IL-17 também regula a IL-18 e IL-8 que são proteínas quimioatraentes para macrófagos e linfócitos T CD4 (CHO et al.,

2008)(HOSPITAL, 1996). $TNF\alpha$ e IL-1 sinergizam com a IL-17 aumentando a produção de IL-15 que estimula a proliferação de linfócitos no *pannus* (CODIVILLA et al., 2006). Dessa forma, a IL-17 promove a manutenção da inflamação por várias vias além de manter o ambiente altamente inflamado por meio da ativação de citocinas inflamatórias, recrutamento de mais células e angiogênese (Figura 6).

A estrutura da cartilagem é mantida por células chamadas condrócitos que possuem a função de manter a integridade da cartilagem através da síntese de proteoglicanos e colágeno. Na AR ocorre a formação do *pannus* que é responsável pela destruição da cartilagem, e um dos fatores responsáveis pela destruição é a IL-17 e sua relação com o metabolismo do condrócitos.

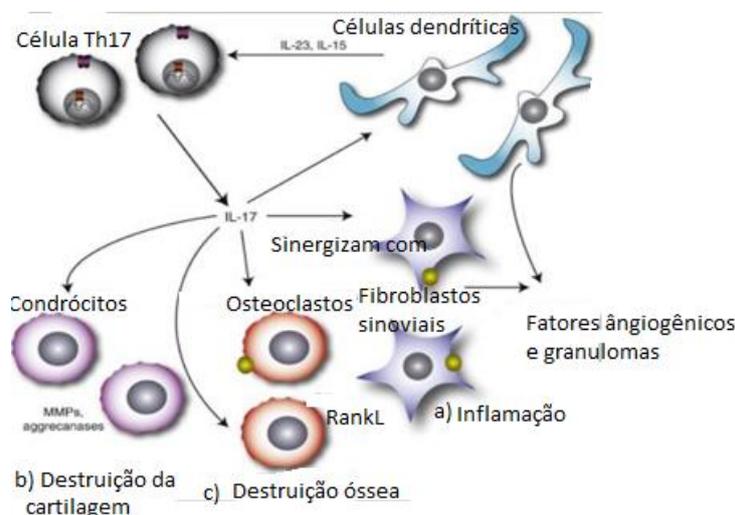


Figura 6- Papel da IL-17 na AR. O linfócito Th17 libera a citocina IL-17 que sinergiza com outras citocinas pró-inflamatórias induzindo: (a) ativação de fibroblastos sinoviais e células dendríticas tornando o ambiente propício ao desenvolvimento das células Th17; (b) modificação fenotípica de condrócitos, resultando na produção de agregados e MMPs que participam da destruição da cartilagem; (c) suprarregulação de RANKL em células de suporte de osteoclastos e fibroblastos sinoviais que promovem a erosão óssea (GILLESPIE, 2007).

Tratamentos atuais

O tratamento para a AR visa diminuir a atividade da doença para atingir a remissão clínica em médio e longo prazo prevenindo a progressão do dano estrutural, incapacidade e manifestações sistêmicas (HUA; BUTTGEREIT; COMBE, 2020). Os tratamentos atuais incluem anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), glicocorticoides

(GCs), imunossupressores e DMARDs, além dos tratamentos não farmacológicos como a fisioterapia (Figura 7) (SMOLEN; ALETAHA, 2017).

Os AINES incluem diclofenaco, aspirina e ibuprofeno, e possuem a função de aliviar a dor, mas não modificam a doença, pois não previnem danos a articulação. O mecanismo de ação dos AINES inclui a inibição da enzima COX, responsável pela produção de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (FAICH et al., 2000). Porém, mesmo que AINES aliviem os efeitos da artrite eles possuem efeitos colaterais renais, hepáticos, gastrointestinais e cardiovasculares (BRUNE; PATRIGNANI, 2015) (CROFFORD, 2013) (BADSHA; HARIFI; MURRELL, 2020).

Os GCs são utilizados em pacientes com AR em doses pequenas, e principalmente no início da doença, juntos com DMARDs. Isso porque, GCs possuem ação mais rápida na indução de remissão da doença (HUA; BUTTGEREIT; COMBE, 2020). O benefício de GCs é limitado, pois promovem efeitos colaterais como hipertensão, osteoporose, glaucoma, obesidade abdominal, diabetes, retardo de crescimento em crianças e depressão (OAKLEY; BUSILLO; CIDLOWSKI, 2017). Alguns estudos já relatam que o uso de corticoides pode diminuir a densidade óssea (COOPER; COUPLAND; MITCHELL, 1995), e seu uso pode causar aumento da possibilidade de fraturas em pacientes com AR (ABTAHI et al., 2021)

DMARDs são um conjunto de fármacos com propriedades antirreumáticas e são subdivididas em 3 tipos: fármacos sintéticos convencionais, que incluem metotrexato, hidroxicloroquina e sulfadiazina; fármacos sintéticos direcionados, que incluem inibidores de Janus Quinase (JAK) 1/2; e fármacos biológicos como inibidores de TNF α e seu receptor, inibidores de IL-6 e seu receptor, anticorpos de depleção de células B e inibidores de moléculas co-estimulatórias (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020).

O metotrexato possui função análoga ao ácido fólico interferindo na atividade da dihidrofolato redutase e inibindo a síntese e o metabolismo de purinas. Além disso, inibe a ligação do IL-1 β ao seu receptor diminuindo respostas inflamatórias (LITTLEJOHN; MONRAD, 2018) (RAJAGOPALAN et al., 2002). Sulfadiazina é uma pro-droga metabolizada *in vivo* em seus dois componentes ativos sulfapiridina e ácido 5-aminossalicílico (LITTLEJOHN; MONRAD, 2018). Melhora a articulação reduzindo a rigidez matinal e dor. Porém produz efeitos colaterais como reações do sistema nervoso central, náuseas, diarreia, reações de hipersensibilidade, neutropenia, trombocitopenia e pan-hipogamaglobulinemia (FARR et al., 1984) (CILDAG;

SENTURK, 2017). Hidroxicloroquina e cloroquina são utilizados como antimalárico e possui efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores o que as tornam eficientes para controlar o dano articular na AR. A sua propriedade anti-inflamatória consiste em neutralizar o pH dos lisossomos e endossomos, inativando proteases ácidas, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (KYBURZ; BRENTANO; GAY, 2006). Entre os efeitos colaterais desse medicamento, se destaca a toxicidade ocular que possui efeito irreversível mesmo com a retirada do medicamento, pois causa a degeneração do epitélio pigmentar da retina e da retina neurosensorial (SHINJO et al., 2007).

DMARDS sintéticas direcionadas foram desenvolvidas com finalidade de serem específicas na inibição de via de transdução de sinal JAK/STAK. JAK é a principal quinase associada a receptores de citocinas inflamatórias, responsável pela fosforilação de resíduos de tirosina na cauda citoplasmática do receptor levando a transdução de sinais e ativação de ativadores de proteína de transdução (STAT) (KOTYLA, 2018). Dessa forma o tratamento com DMARDs sintéticas direcionadas, evita que citocinas sejam produzidas e liberadas, controlando a inflamação. Os efeitos colaterais incluem diarreia, nasofaringite, dor de cabeça e infecção do trato urinário, e com mais de 3 meses é comum ocorrer também infecções do trato respiratório superior, nasofaringite e bronquite (KOTYLA, 2018).

Os DMARDs biológicos mais utilizados envolvem a neutralização ou regulação da atividade de citocinas e seus receptores, regulação da sinalização celular inflamatória, ou inibição de linfócitos T ou B (LIN; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020). A neutralização de TNF α ou seu receptor pode ser feita com anticorpos anti-TNF- α . Existem anticorpos de diferentes gerações, compostos por proteínas humanizadas (infixmabe) ou de origem humana recombinante (etanercept ou adalimumab). A escolha do TNF- α como alvo terapêutico é interessante, pois ele atua de forma central na inflamação na artrite, por estar presente junto com seus receptores (p55 e p75 TNFR) em muitos locais da sinóvia incluindo a cartilagem. A neutralização da TNF- α regula negativamente a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e GM-CSF (CHARLES et al., 2021). Os efeitos colaterais de cada medicamento que age como inibidor de TNF- α variam muito, mas destaca-se cânceres de pele e melanoma (MCKENNA; STOBAUGH; DEEPAK, 2014), pneumonia, infecção urinária, celulite, apendicite, herpes zoster (BURMESTER et al., 2013).

A IL-6 é uma citocina inflamatória de resposta aguda e auxilia na ativação do linfócito T e na diferenciação do linfócito B. Possui várias funções semelhantes a hormônios, como metabolismo de lipídeos, resistência à insulina, doenças vasculares e regulação neuroendócrina (AVCI; FEIST; BURMESTER, 2018). A IL-6 está relacionada com outros marcadores de AR e com manifestações clínicas da doença como inchaço nas articulações e rigidez matinal (ATSUMI et al., 2002) (SASAI et al., 1999). Os medicamentos utilizados no bloqueio de IL-6 são os anticorpos monoclonais tocilizumab, satralizumab e sarilumab. Os efeitos colaterais mais comuns incluem infecções cutâneas e subcutâneas, dislipidemia, neutropenia, trombocitopenia e níveis aumentados de enzimas hepáticas (DHILLON, 2014).

Abatacept é um medicamento cujo princípio ativo é a proteína associada a linfócitos T citotóxicos ou CTLA4-Ig. A CTLA4 liga-se ao complexo CD80/CD86 inibindo a apresentação de antígenos, o que leva a diminuição da diferenciação de osteoclastos diminuindo o dano articular na AR (Okada et al., 2019). Pacientes com AR geralmente apresentam algum nível de deficiência em CTLA4, o que destaca a manutenção da CTLA4 na manutenção da tolerância imunológica (LORENZETTI et al., 2019). O tratamento com abatacept apresenta menor risco de infecções com câncer comparado com outras DMARDs biológicas (BLAIR; DEEKS, 2017), porém seu uso está relacionado com maior risco de câncer de pele não melanoma e psoríase comparado com outras DMARDs (OZEN et al., 2019).

Os linfócitos B são essenciais para a manutenção da imunopatogênese na AR, isso porque eles secretam e mantêm os níveis de fator reumatoide e anticorpos anti-proteínas citrulinadas que precedem o início da doença. Dessa forma, o anticorpo monoclonal quimérico direcionado contra a molécula CD20 presente em linfócitos B, conhecido como rituximabe, comumente usado para leucemias linfoides B, pode ser utilizado no tratamento de AR (RAMWADHDOEBE et al., 2019). Os pacientes submetidos a este tratamento apresentam uma melhora significativa, porém induz imunodeficiências relacionadas à produção de anticorpos como agamaglobulinemias (POLLASTRO et al., 2019).

Os medicamentos atuais promovem alternativas para a melhora clínica e imunológica a fim de modular negativamente a resposta inflamatória. Porém, a grande maioria dos medicamentos em uso causam efeitos colaterais nocivos que afetam a qualidade de vida de pacientes com AR. Dessa forma é necessário desenvolver nova

estratégia de tratamento para controlar a AR sem causar tantos efeitos colaterais e que visem suprimir a resposta inflamatória sistêmica e local.

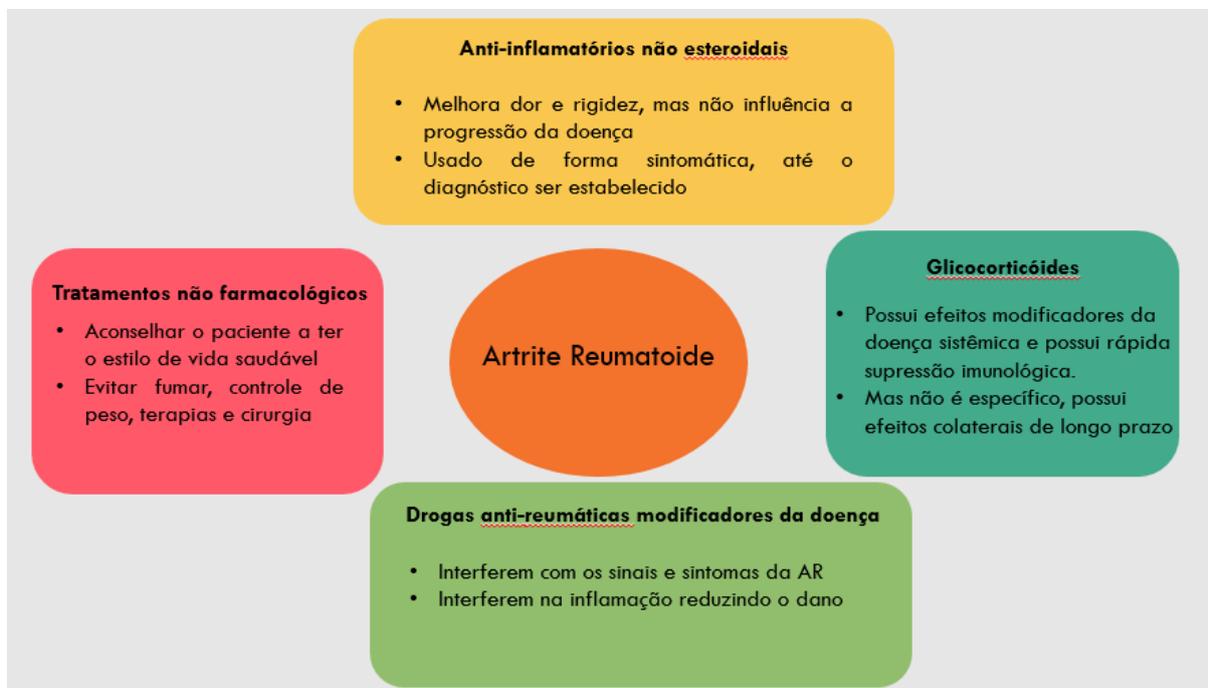


Figura 7- Estratégias de tratamento para AR. O tratamento não farmacológico inclui aconselhamento de mudança de estilo de vida, fisioterapia e procedimentos cirúrgicos para remover e/ou substituir as articulações afetadas e as áreas ósseas. Uso de anti-inflamatórios não esteroidais, são usados em tratamentos sintomáticos e/ou até ter o diagnóstico da AR seja estabelecido. Os glicocorticoides têm efeitos rápidos, mas seu uso em longo prazo é limitado devido a efeitos colaterais graves. Drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) são usadas para direcionar a inflamação e prevenir danos nas articulações e progressão da doença. (SMOLEN; ALETAHA, 2017)

Artrite induzida por colágeno

Modelos usando camundongos com aspectos semelhantes à patogênese em humanos são uma ferramenta importante para investigar mecanismos *in vivo*. Os modelos podem ser induzidos ou espontâneos. Os mecanismos imunopatogênicos *in vivo* podem ser desencadeados por imunização ativa, por imunização passiva ou por produtos irritantes, resultando em inflamação crônica (CAPLAZI et al., 2015).

A artrite induzida por colágeno (AIC) envolve imunização ativa e foi desenvolvida em ratos e depois em camundongos. Ambas as espécies desenvolvem poliartrite erosiva monofásica aguda após a imunização com colágeno II, que pode ser bovino, humano, suíno ou de aves (CAPLAZI et al., 2015). O modelo AIC na cepa

DBA/1 de camundongo é o modelo conhecido como “gold standart”, pois é o que mais se assemelha com a AR humana, além da semelhança com a molécula de MHC de classe II como fator genético pois expressam halótipos suscetíveis a AR (VINCENT et al., 2012). Na AIC a resposta inflamatória é direcionada a um antígeno articular que é o colágeno tipo II,. Dois atributos importantes na AIC que se assemelham a AR são a quebra da tolerância e a geração de auto anticorpos contra o colágeno que tornam esse modelo de escolha para estudos dessa doença (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018). Os linfócitos T CD4⁺ que desempenham papel dominante nesse modelo são as células Th1 e principalmente a Th17 (MCNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015).

Tabela 1- Semelhanças e diferenças entre Artrite Reumatoide (AR) e o modelo de artrite induzida por colágeno (AIC) em ratos e camundongos. Adaptado do artigo (JOE; WILDER, 1999).

Modelo animal	Semelhanças com AR	Diferenças da AR de camundongos com humanos
AIC em camundongos	Envolvimento articular simétrico, articulações periféricas afetadas, sinovite, erosão de cartilagem, e osso, infiltrado de células inflamatórias, formação de <i>pannus</i> , edema e eritema, geneticamente regulado por genes do MHC.	Os machos apresentam uma maior incidência a CIA. Já na AR em humanos a doença afeta mais as mulheres.
AIC em ratos	Maior suscetibilidade em fêmeas, envolvimento simétrico das articulações, articulações periféricas afetadas, hiperplasia sinovial, infiltrado de células inflamatórias, geneticamente regulado por genes do MHC, produção de fator reumatoide.	Respostas anticolágeno não presentes em muitos casos de AR

Existem várias espécies de animais que são suscetíveis a AIC como ratos (MCNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015), macacos (PRIMATE; DISEASES, 2001) e

camundongos. As cepas de camundongos mais suscetíveis a desenvolverem artrite são o DBA/1, B10.Q e B10.RIII. Entre esses, o DBA/1 é o mais utilizado e a imunização é feita com colágeno tipo II emulsificado em adjuvante completo de Freud. Os sinais clínicos aparecem entre 21-28 dias após a imunização inicial (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

Figura 8- Semelhanças e diferenças entre Artrite Reumatóide (AR) e o modelo de artrite induzida por colágeno (AIC) em ratos e camundongos.

A AR está associada a expressão do MHC de classe II, por isso apenas camundongos com haplótipos H-2q e H-2r são suscetíveis a AIC. A suscetibilidade é relacionada a moléculas de classe 2 I-Aq e I-Ar (Tabela 2). Cada molécula associada é capaz de se ligar ao peptídeo de colágeno tipo II que, apresentado às células T, promovem o desenvolvimento da AIC. Dessa forma, linhagens de camundongos DBA/1 e B10.Q, que apresentam moléculas I-Aq, só desenvolvem artrite após a imunização com colágeno bovino, colágeno de frango e colágeno humano, mas não desenvolvem artrite a colágeno de suíno. Enquanto camundongos B10.RIII que expressam I-Ar desenvolvem artrite após a imunização com colágeno bovino ou colágeno suíno, mas não desenvolvem com colágeno de frango ou colágeno humano. Isso indica que determinantes antigênicos de células T estão envolvidos na indução de artrite em diferentes cepas de camundongos (Figura 9) (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003).

Tabela 1- Diferentes cepas de camundongos são suscetíveis a artrite com peptídeos específicos derivados de colágenos (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

Cepas suscetíveis	Halótipo classe 2	Incidência Artrite	Início da Artrite
DBA/1	I-A ^q	80-100	21-28 dias
B10.M-DR1	DRB1*0101	80-100	21-28 dias
B10.M-DR4^a	DRB1*0401	50-80 ^a	21-28 dias

B10.RIII	I-A ^r	80-100	21-28 dias
B10.Q	I-A ^q	80-100	21-28 dias
DBA-TCR Tg	I-A ^q	80-100	12-18 dias
C57BL/6^b	I-A ^b	Variável ^b	Variável ^b

Fosfatidilserina (PS), apoptose e regulação da inflamação

A manutenção da assimetria dos fosfolipídeos na membrana das células é importante para manter a função da membrana celular. Essa assimetria é causada pela disposição desigual dos componentes membranares nos dois folhetos da bicamada fosfolipídica. Os fosfolipídios aniônicos são voltados para a porção citoplasmática como a fosfatidiletanolamina (PE) e PS, enquanto os fosfolipídios catiônicos como a fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) e esfingolipídios são enriquecidos na superfície externa. Outros fosfolipídios menores como ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-monofosfato (PIP) e fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP 2) também são enriquecidos no lado citoplasmático da membrana. Assim que se inicia do processo apoptótico ocorre à perda da assimetria de membrana da bicamada lipídica com a PS exposta para o lado extracelular da bicamada lipídica. Esse processo ocorre em condições normais e em condições patológicas (TODA et al., 2015).

Células que expõem PS na membrana plasmática são removidas pelos fagócitos que agem de forma rápida e eficaz (NAEINI et al., 2020). Em condições normais, mesmo que muitas células entrem em processo apoptótico ao mesmo tempo, é difícil encontrar restos de células apoptóticas em tecidos. O processo em apoptótico é importante para a manutenção de várias doenças como, por exemplo, as degenerativas do sistema nervoso central, aterosclerose e doenças autoimunes (NAEINI et al., 2020).

Dessa forma, pode-se dizer que a apoptose acontece de forma natural sendo parte da homeostase celular, geralmente ocorrendo quando as células entram em senescência e/ou sofrem algum tipo de dano. Após a exposição da PS no folheto externo da célula apoptótica, a célula é rapidamente fagocitada pelo macrófago ou pela célula dendrítica imatura (Figura 11) (CHAO; MAJETI; WEISSMAN, 2012) (SEGAWA; NAGATA, 2015). E após ser endocitada, o fagossoma é fusionado ao

lisossoma, os componentes celulares são degradados e podem ser reutilizados (Satoshi Toda et al, 2015). A PS além de servir de sinal e ligante para a fagocitose, também possui função imunorreguladora, pois seu reconhecimento por macrófagos resulta na inibição da liberação de citocinas pro-inflamatórias e induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002) (SHI et al., 2007).

Dessa forma, a PS é um alvo molecular relevante no processo fisiológico de regulação da resposta inflamatória e do dano tecidual. Portanto, justifica-se que novos mecanismos terapêuticos sejam buscados neste contexto, pois efeitos anti-inflamatórios e imussupressores estão envolvidos (SAVILL et al., 2002). Existem diversos receptores de PS que participam desse processo, agindo de forma colaborativa tanto na remoção de células apoptóticas quanto na regulação da resposta inflamatória. Os receptores TAM compreendem 3 proteínas: Axl, Tyro3 e MerTK. Estas proteínas são receptores tirosina quinase que reconhecem PS com auxílio das proteínas plasmáticas ProS e Gas6 (NAKANO et al., 1997). As células em processo apoptótico interagem com receptores TAM na superfície de fagócitos, induzindo a liberação de IL-10 e TGF- β (STANFORD et al., 2014). Além disso, TGF- β é fundamental para o início da formação de células T reguladoras (Treg), que desempenham um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento da autoimunidade (CHEN et al., 2003) (SAKAGUCHI et al., 2010) (Figura 8).

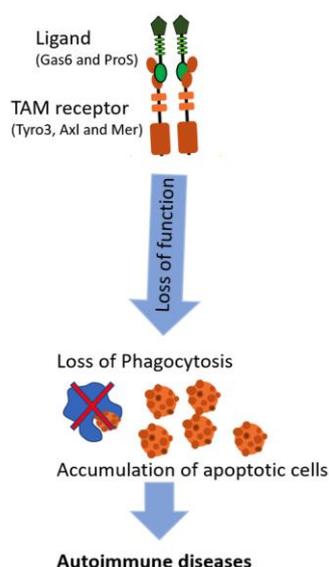


Figura 10 – Receptores TAM. Tyro3, Axl e MerTK são capazes de reconhecer PS na superfície de células apoptóticas e induzir a fagocitose dessas células e produção de

citocinas anti-inflamatórias. Defeitos nesse sistema de reconhecimento podem estar relacionados com acúmulo de células mortas, inflamação intensa e desenvolvimento de autoimunidade (Wium *et al*, 2018).

Lipossomos contendo PS para modular inflamação

Vários estudos já demonstraram que a utilização de lipossomos é eficiente para entregar fármacos e agentes imunomoduladores para células e órgãos alvo (KLEINERMAN *et al.*, 1983). Isso acontece porque, os lipossomos são facilmente ingeridos por células fagocíticas como o macrófago. Alguns trabalhos iniciais encapsularam linfocinas em lipossomos direcionados aos macrófagos infectados por *Leishmania* com a finalidade de aumentar atividade microbicida (GILBREATH *et al.*, 1985). No entanto, foi observado que os lipossomos contendo PC e PS tinham capacidade inversa, ou seja, diminuía a função microbicida de macrófagos, facilitando a infecção (GILBREATH *et al.*, 1985). Após a descoberta que os lipossomos contendo PC e PS agem inibindo a ativação clássica de macrófagos, o mesmo grupo investigou a composição de ácidos graxos fosfolipídios e descobriram que apenas a PS possui esta ação.

Entre esses mecanismos se destaca a utilização de lipossomos contendo PS na superfície, com a finalidade de mimetizar os efeitos do reconhecimento de células apoptóticas. Existem alguns estudos nesse sentido em modelos de autoimunidade como diabetes e encéfalo autoimune experimental (EAE) (PUJOL-AUTONELL *et al.*, 2015). No modelo de EAE houve a diminuição de citocinas pró inflamatórias como IL-6, IL-12 e IFN- γ IL-2 e TNF- α causando a diminuição da inflação exacerbada, aumento de linfócitos Treg e melhora dos sinais clínicos da doença (ROBERTS *et al.*, 2015). No modelo de diabetes autoimune tipo 1, foi mostrado que a utilização de lipossomos contendo PS contribui para aumentar a tolerância periférica, pois diminuiu a capacidade proliferativa de células T e o nível de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-17. O tratamento também elevou os níveis de linfócitos T expressando o fator de transcrição de Foxp3+, característico de linfócitos Treg. Com isso, o tratamento conseguiu diminuir a incidência da doença diminuindo mediadores inflamatórios e aumento a tolerância periférica (PUJOL-AUTONELL *et al.*, 2015). Os lipossomos contendo PS na superfície são construídos com a finalidade de mimetizar o processo de reconhecimento de células apoptóticas (Figura 9) e dessa forma suprimir a resposta inflamatórias em modelos de autoimunidade e em doenças inflamatórias (HAREL-ADAR *et al.*, 2011) (PUJOL-AUTONELL *et al.*, 2015).

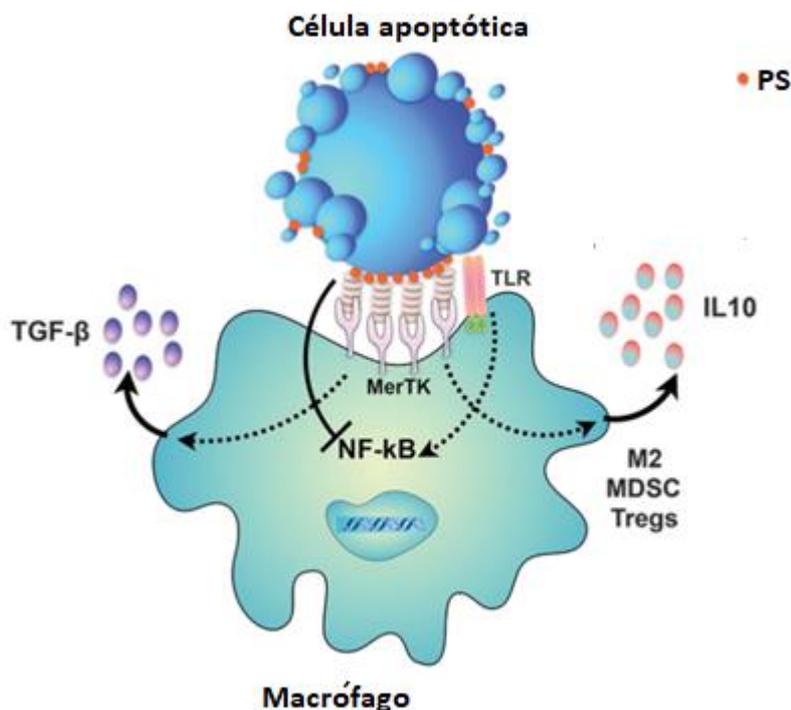


Figura 11- A fagocitose de células apoptóticas promove a homeostase. Após a célula fagocítica reconhecer a célula que está em processo apoptótico pela interação da fosfatidilserina na célula apoptóticas com o receptor MerTK no macrófago ocorre a transdução de citocinas pelo fator de transcrição NF-kB, e posteriormente ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10) promovendo a homeostase (BIRGE et al., 2016).

Justificativa

A apoptose é um evento importante para manter a homeostase tecidual, através da eliminação de células infectadas, lesionadas ou que já exerceram sua função (SHIN et al., 2019). O processo apoptótico também é de grande relevância para controlar a reposta inflamatória no tecido, através da supressão de respostas exacerbadas contra células próprias que precisam ser repostas. Além disso, em doenças autoimunes, como é o caso da AR, já foi descrito que o balanço entre a apoptose e a necrose pode contribuir para aumentar o processo inflamatório (LIMA et al., 2009). Por isso a utilização de meios que busquem induzir a liberação de citocinas reguladoras que estão associadas ao reconhecimento de células apoptóticas poderiam minimizar a inflamação e melhorar os sinais e sintomas da doença.

Trabalhos anteriores utilizaram estruturas que contém PS na superfície como lipossomos e nanopartículas, como forma de mimetizar o processo que ocorre durante

o reconhecimento deste fosfolípido na superfície de membranas celulares. Esta estratégia possivelmente possibilitará que a regulação da resposta inflamatória seja feita por mecanismos homeostáticos, evitando efeitos colaterais observados com o uso de terapias farmacológicas atuais. Dessa forma, é justificável o uso de lipossomos contendo PS na superfície como forma de auxiliar na regulação da resposta inflamatória em modelos de doenças inflamatórias autoimunes, como é o caso de AIC.

3-OBJETIVO

Avaliar a eficácia de lipossomos contendo fosfatidilserina em camundongos DBA/1 no modelo de artrite induzida por colágeno.

4-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar macroscopicamente a progressão do edema e eritema articular durante e após o tratamento sistêmico com lipossomos contendo PS;
- Acompanhar a perda de peso e capacidade de locomoção dos animais durante e após o tratamento sistêmico com lipossomos contendo PS;
- Avaliar a nocicepção térmica e mecânica dos animais durante e após o tratamento sistêmico com lipossomos contendo PS;
- Analisar as alterações histopatológicas, nas articulações dos animais após o tratamento com aos lipossomos contendo PS;
- Quantificar as citocinas séricas IL-17 e TNF- α nos animais após o tratamento com aos lipossomos contendo PS.

5-METODOLOGIA

5.1- Animais

O experimento foi realizado com camundongos fêmeas da linhagem DBA/1, de 7 a 9 semanas, pesando 20 g. Esses animais foram obtidos da Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da FIOCRUZ. Mantidos em ciclos claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* em biotério convencional. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz, ref. L-041/2018 e pela CEUA do Campus UFRJ Macaé – ref. MAC075.

5.2- Artrite induzida por colágeno e avaliação clínica da doença

Os animais foram imunizados com 100- μ g de colágeno bovino tipo 2 (Chondrex, NY, EUA), dissolvidos em 0,1 M de ácido acético, e emulsificados em CFA (Sigma Aldrich) na proporção 1:1. Cem microlitros dessa emulsão foi injetado na base da cauda dos animais, e após 21 dias da imunização foi realizado um segundo reforço com o mesmo volume de emulsão e quantidade de colágeno emulsificado em IFA (Figura 12) (Sigma Aldrich) (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

5.3- Tratamento com lipossomos contendo PS

Os lipossomos foram preparados da seguinte forma: fosfatidilcolina (PC), PS (Avanti Lipds) e colesterol (Sigma-Aldrich) foram solubilizados em clorofórmio. Para lipossomos de PC a solução tinha razão molar de 5:4 (colesterol:PC); e lipossomos contendo PS, razão molar de 5:4:1 (colesterol:PC:PS). Clorofórmio foi evaporado em atmosfera livre de oxigênio, o filme lipídico criado foi suspenso em PBS e vortexado por 30 minutos. A solução final produzida continha 1 mg/mL de lipídios totais e cada animal recebeu 1 mg/Kg de peso por injeção, ou aproximadamente 20 mg de lipossomos. Os lipossomos foram injetados por via intraperitoneal nos camundongos 3 vezes por semana durante 3 semanas. Os grupos experimentais foram: grupo 1 – controle sadio; grupo 2 – animais imunizados com CFA na ausência de colágeno; grupo 3 – animais imunizados com CFA e colágeno (aicc); grupo 4 – animais aicc tratados com PBS; grupo 5 – animais aicc tratados com lipossomos contendo PC; grupo 6 – animais aicc tratados com lipossomos contendo PS.

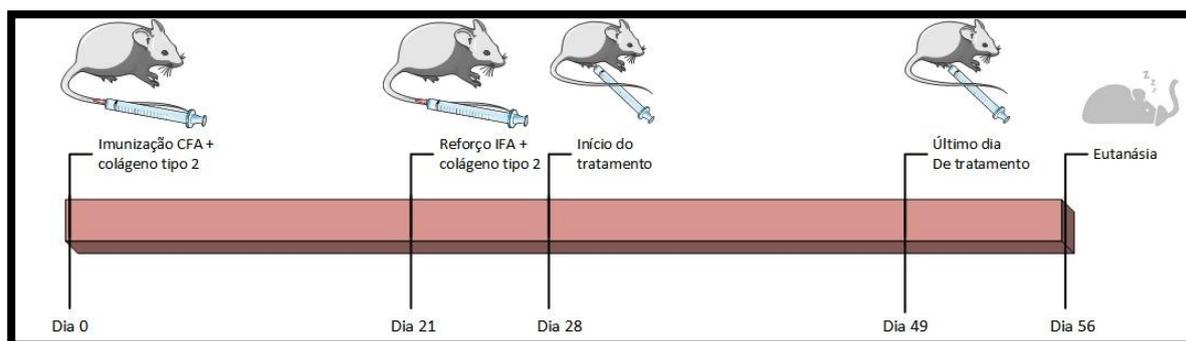


Figura 12 Linha de tempo de indução e tratamento da AIC. No dia zero os animais foram imunizados com colágeno tipo II diluído em ácido acético e emulsificado em adjuvante completo de Freund (CFA). No dia 21 foi realizado o reforço da imunização com colágeno tipo II emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (IFA). A partir do dia 28 os animais apresentaram manifestações clínicas da artrite e se iniciou o

tratamento com os animais, que durou até o dia 49. No dia 56 foi realizada a eutanásia e coleta das patas e do soro dos animais.

5.4- Avaliação clínica

A avaliação clínica dos animais foi feita através de um escore, pelo grau de acometimento de 0 a 3, no qual 0 corresponde a ausência de manifestação clínica e 3 corresponde a maior gravidade. Dessa forma foram analisados três parâmetros: edema/eritema, mobilidade e peso. No caso do edema/eritema foram analisadas cada pata individualmente. Escore 0 - nenhuma falange acometida; escore 1: pelo menos 1 falange acometida; escore 2: até duas falanges acometidas; escore 3: 2 ou mais falanges acometidas (Figura 13) ((BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

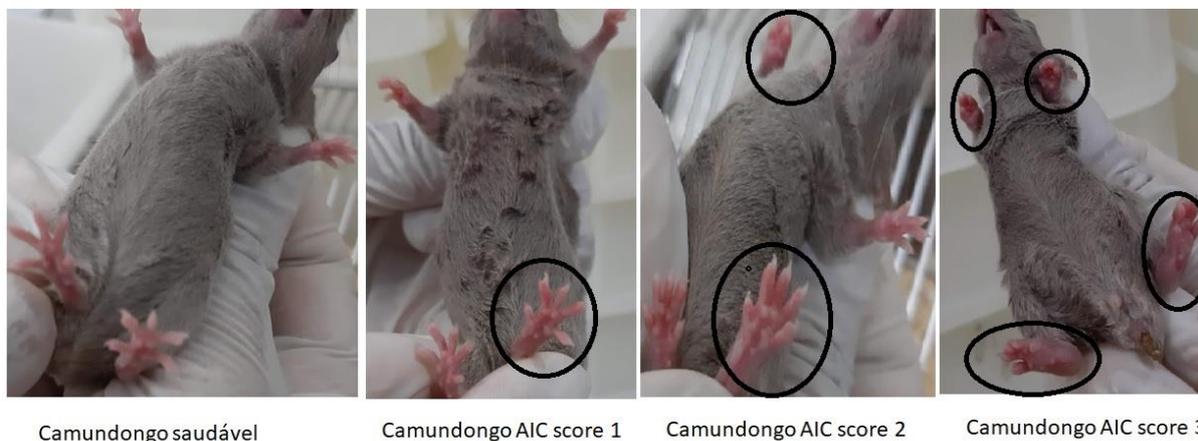


Figura 13- Acompanhamento clínico dos animais com AIC. Todas as patas foram analisadas quanto ao surgimento de edema e/ou eritema nas articulações durante o experimento. Imagens mostram as patas (círculos) relacionadas com os scores.

A mobilidade foi avaliada pela capacidade do animal conseguir se locomover em quadrantes de 5 cm² cada, desenhados em uma caixa. Escore 0: animal percorre mais de 2 quadrantes ou consegue se levantar nas patas traseiras; escore 1: animal percorre até 2 quadrantes; escore 2: animal percorre até 1 quadrante; escore 3: animal não se locomove. Cada animal foi avaliado por até 3 minutos (Figura 14).



Figura 14- Teste de mobilidade - o teste foi realizado dentro da caixa com quadrantes marcados, foi avaliado quantos quadrantes o animal consegue percorrer.

Os animais foram pesados no dia 0 e durante todos os dias do tratamento. Este acompanhamento gerou um escore de peso, levando em consideração o quanto de peso foi ganho/perdido ao longo do experimento. Escore 0: manutenção ou ganho de peso; escore 1: perda de até 10% do peso; escore 2: perda de 10-15% de peso; escore 3: perda de 15% ou mais do peso.

5.5- Teste de hiperalgesia térmica

Este modelo usa a temperatura como estímulo nociceptivo. Os animais foram postos sobre a placa quente (Insight, modelo EFF-361), com a temperatura ajustada a $52,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e quando lamberam, agitaram vigorosamente ou levantaram a pata foram retirados (Figura 15). O tempo para resposta nociceptiva foi cronometrado em segundos. As aferições de tempo de latência foram feitas nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos (SILVA et al., 2013). Foi estipulado um tempo máximo de permanência na placa de 30 s, a fim de evitar lesões teciduais. Esse teste foi repetido 1 vez por semana durante as 3 semanas de tratamento e uma semana depois dos animais terem terminado o tratamento



Figura 15- Teste da placa quente. Os animais são mantidos sobre a placa quente a 52°C, por até 30 segundos, em intervalos de tempo de 10 minutos (MELLO, 2017).

5.6- Teste de hiperalgesia mecânica (Von Frey manual)

Este teste consiste em manter os animais sobre uma malha de grade e pressionar a pata traseira para um filamento Von Frey usando um anesthesiômetro manual com gramaturas diferentes para avaliar a dor do animal. Os camundongos foram colocados, 30 minutos antes para aclimatização, em uma câmara de acrílico fixada em cima de uma grade de malha de arame para permitir o acesso para a superfície ventral das patas traseiras. O filamento foi aplicado verticalmente nas patas traseiras direita, com um aumento gradual de pressão (0,2; 2; 4 g) até que a pata foi retirada, encolhida ou lambida (Figura 16). O estímulo manual foi aplicado 5 vezes na pata com intervalo de cinco segundos. A reação à dor foi gravada como sinal positivo para a reação do animal e negativo para o animal que permanecer sem reação (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

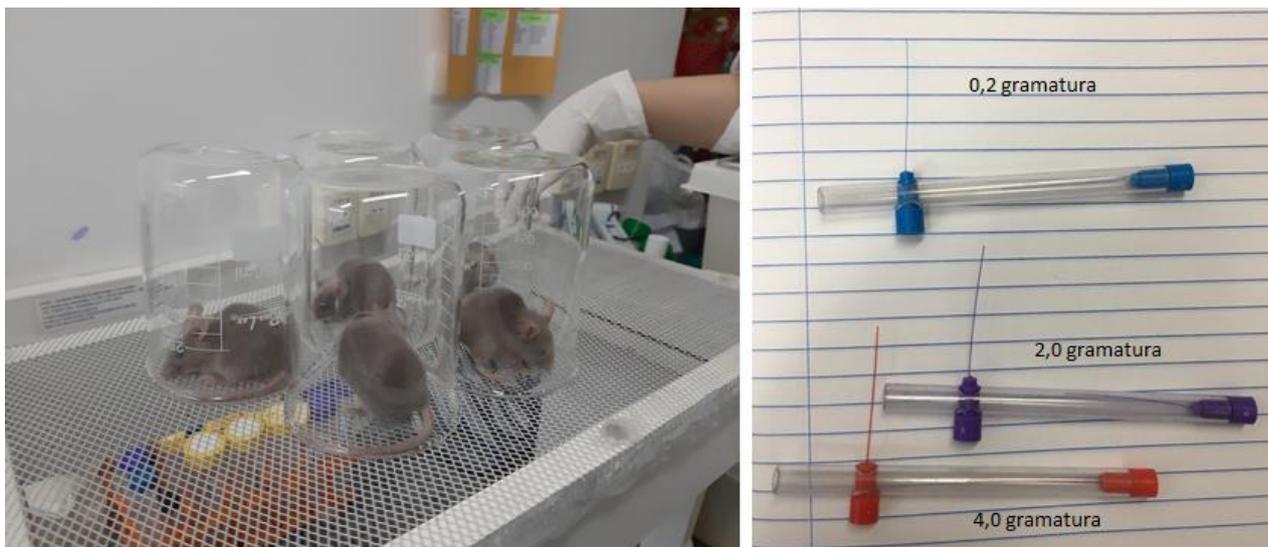


Figura 16- Teste de Von Frey. Os animais foram mantidos sobre uma tela gradeada presos por um Becker sob eles para que se aclimassem antes de iniciar o experimento. Após o período foram aferidos com anestesímetros com gramaturas de 0,2; 2,0 e 4,0 na mesma pata.

5.7- Dosagem de citocinas séricas

Após o período de tratamento com os lipossomos os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados, então o sangue coletado pela veia ocular. As citocinas séricas como IL-17E, TGF β e TNF α foram quantificadas pelo método de ELISA, de acordo com as informações do fabricante (Peprotech).

5.8- Análise histopatológica

As patas dos animais foram coletadas e fixadas em formaldeído 4% por um período de 36 horas. As patas foram descalcificadas em solução de EDTA 10% por 8 semanas. O material foi desidratado em banhos de álcool com aumento progressivo (70%, 90%, 100%) por duas vezes por trinta minutos em cada banho. A clarificação foi feita em 3 banhos sucessivos de 30 minutos em xilol 100%. O material foi submetido a um banho de parafina por 30 minutos, para depois ser emblocado em parafina. Foram feitos cortes de 3 μ m, fixados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina. As análises histológicas foram realizadas e o critério para medir a inflamação foi o seguinte: leve, se houve de 1-5 células inflamatórias encontradas no campo mais afetados da amostra; moderada, se houve de 6-15 células inflamatórias encontradas no campo mais afetados da amostra; severa, se houve acima de 15 células inflamatórias encontradas no campo mais afetados da amostra. Os critérios foram determinados a partir da classificação histológica para lesões de articulação para o modelo de osteoartrite (GLASSON et al., 2010).

6- RESULTADOS

6.1- Avaliação das manifestações clínicas da AIC em DBAs

Os animais com AIC foram avaliados quanto a progressão das manifestações clínicas durante o tratamento com lipossomos contendo PS. A presença de edema e eritema nas articulações das quatro patas dos animais foi avaliada através de observação macroscópica. Não observamos alterações no aparecimento e progressão destes sinais clínicos ao longo do período observado (Figura 17).

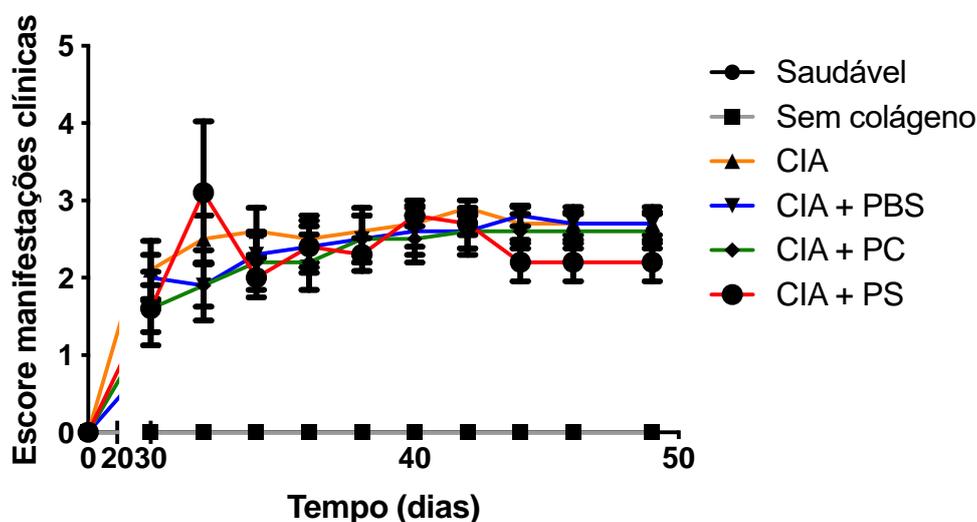


Figura 17- Manifestação clínica dos camundongos com AIC. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Os animais foram avaliados clinicamente durante todo o período de tratamento. O escore das manifestações clínicas foi feito pelo acompanhamento da presença de edema e eritema nas falanges de cada pata de cada animal. Ausência de manifestações, escore 0; manifestação em pelo menos 1 articulação, escore 1; manifestação em até 2 articulações, escore 2; manifestação em mais de 2 articulações, escore 3. Resultado em média e erro padrão de dois experimentos.

Avaliamos também a perda de peso que pode ocorrer em animais com dificuldade em se alimentar devido a dor na articulação e consequente problema de locomoção. Porém, assim como na avaliação dos sinais clínicos, diferenças na mudança de peso entre os grupos de animais tratados e controles não foi detectada (Figura 18).

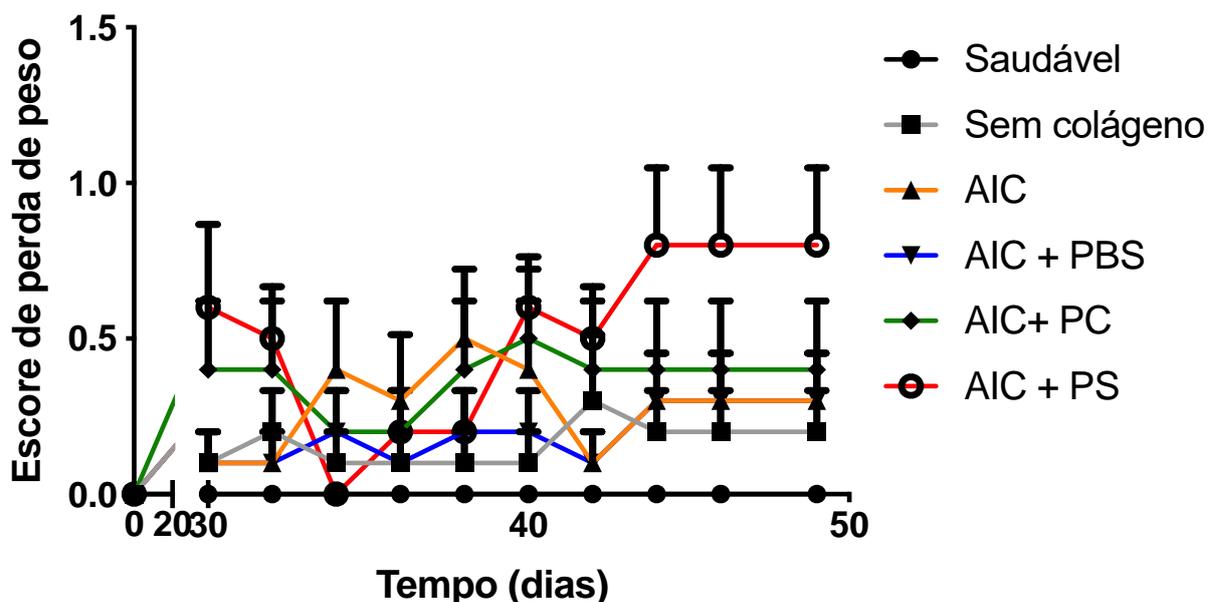


Figura 18- Avaliação de Peso. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. Os animais foram pesados individualmente no dia zero e durante todo o período de avaliação clínica. Camundongos sem perda de peso, escore 0; até 10% de perda de peso, escore 1; 10-20% de perda de peso, escore 2; acima de 30% de perda de peso, escore 3. Resultado em média e erro padrão de dois experimentos.

6.2- Avaliação da mobilidade dos camundongos tratados com lipossomos

O teste de mobilidade foi realizado com a finalidade de avaliar se o tratamento com lipossomos contendo PS teria impacto na capacidade de locomoção do animal. Foi possível observar melhora no escore de mobilidade dos animais tratados com lipossomos contendo PS em comparação com os demais grupos (Figura 19). Este resultado sugere que o tratamento pode aliviar a dor dos animais, o que nos levou a averiguar a nocicepção.

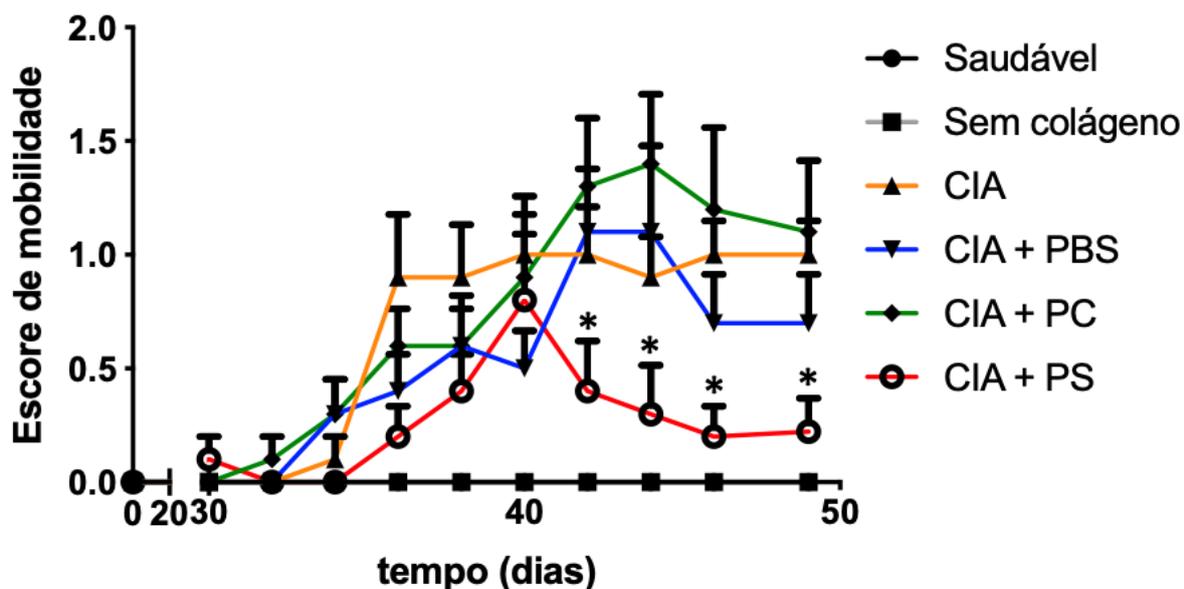


Figura 19- Avaliação do teste de mobilidade. O grupo tratado com PS apresentou uma melhora significativa de locomoção. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. O teste de mobilidade foi realizado durante as 3 semanas de tratamento da AIC, e 1 semana após o período de tratamento. Os animais foram mantidos em caixas por até 2 minutos, e foi observado por quantos quadrantes conseguiam se locomover nesse intervalo de tempo. Animal parado, escore 3; animal locomovendo por 1 quadrado, escore 2; animal locomovendo por 2 quadrados, escore 1; animal locomovendo por 3 ou mais quadrados, escore 0. Resultado em média e erro padrão de dois experimentos. * $p < 0,05$.

6.3- Avaliação da nocicepção mecânica em AIC

Foram realizados testes de nocicepção térmico e mecânico para avaliar se houve melhora no grau de dor nos animais tratados com lipossomos. Para avaliar a dor térmica foi realizado o teste da placa quente. Os animais foram submetidos ao estímulo e o tempo de latência apresentado na figura 20. Não houve diferença de tempo de latência de resposta entre os grupos saudáveis, doentes e tratados (figura 20).

Realizamos a avaliação de nocicepção mecânica utilizando o teste de Von Frey manual. Neste teste os animais foram submetidos a um estímulo com filamentos de diferentes gramaturas a fim de se observar o limiar mecânico de dor destes animais. Observamos que desde a primeira semana no início do tratamento foi possível observar que os animais doentes apresentaram maior sensibilidade ao estímulo

nociceptivo mecânico, quando comparados aos controles (saudável e sem colágeno), principalmente quando filamentos de menor gramatura foi utilizado. Além disso, observamos que o grupo tratado com lipossomos contendo PS apresentaram diminuição significativa da sensibilidade ao estímulo nociceptivo, significativa a partir da segunda semana de avaliação e observável com a utilização do filamento de 0,2 g (Figura 21).

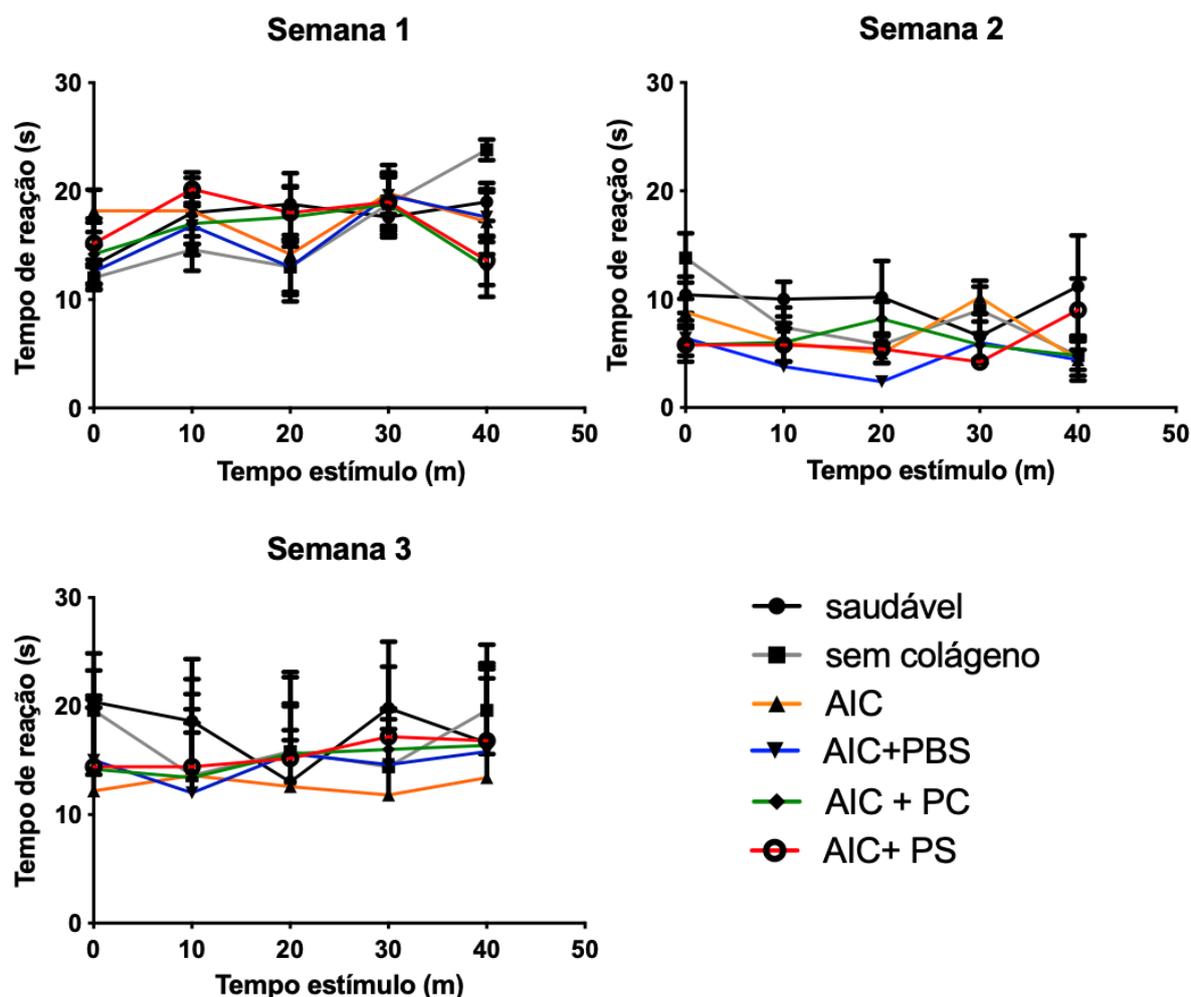


Figura 20- Teste de placa quente por semana. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. No dia 30 após o início do tratamento os animais foram colocados sobre placa quente na temperatura de $52 \pm 0,5$ °C por até 30 segundos em intervalos de 10 minutos (tempo estímulo). Ao agitar, remover ou lambe a pata o tempo de latência de reação foi definido. Resultado em média e erro padrão de um experimentos.

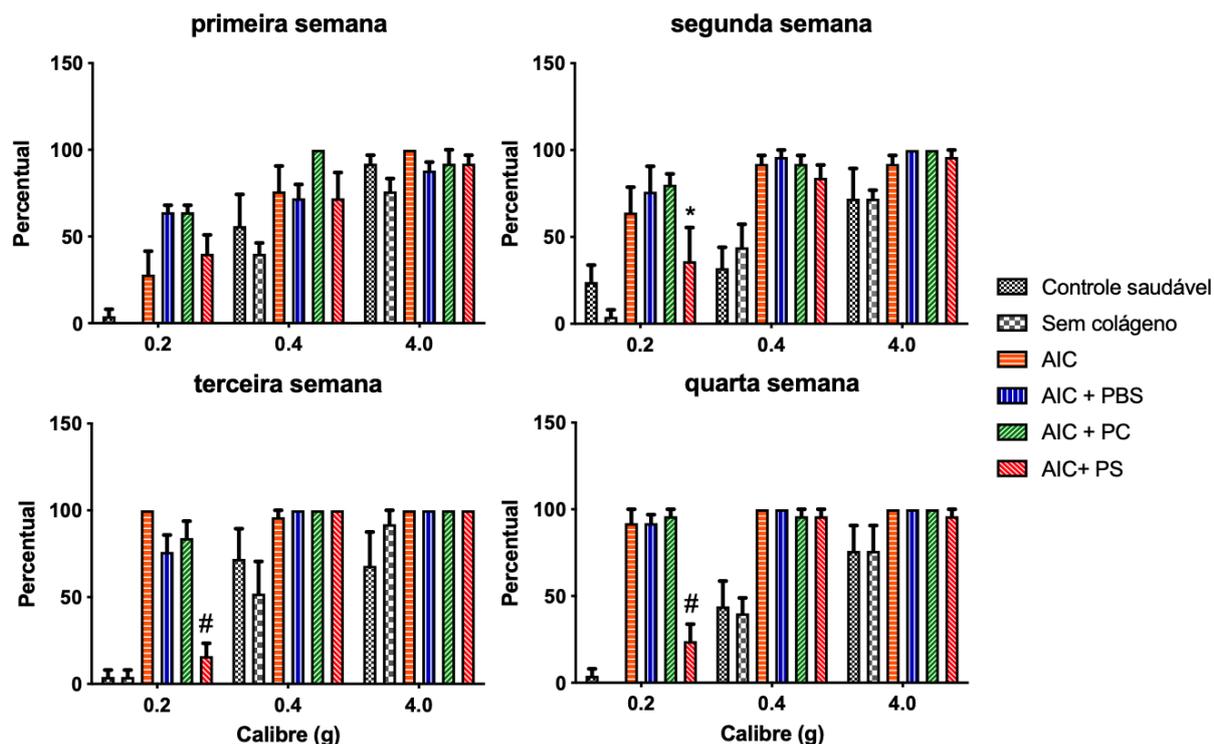


Figura 21- Teste de Von Frey manual por semana. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. Durante 4 semanas os animais foram testados quanto a nocicepção mecânica, através do estímulo com filamentos nas gramaturas 0,2, 2 e 4g, com utilização de um anesimômetro manual. Os animais foram estimulados por 5 vezes em um período de 1 vez por semana por 4 semanas. Percentual de vezes em que o estímulo nociceptivo mecânico causou reação dos animais é mostrado. Resultado em média e erro padrão de um experimento. # $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

6.4- Avaliação do perfil de citocinas

Observamos que os níveis de $TNF\alpha$ diminuíram drasticamente nos animais tratados com lipossomos contendo PS. Porém, o mesmo não acontece com a citocina IL-17 (Figura 22).

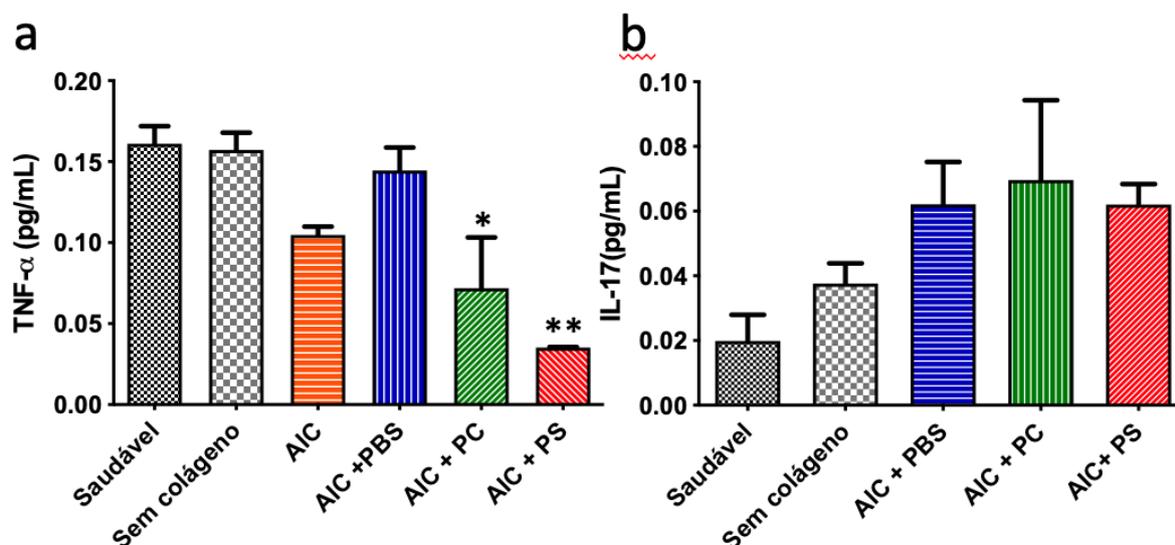


Figura 22- Nível de citocinas séricas. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. O soro dos animais foi obtido e as citocinas (a) TNF α e (b) IL-17 foram dosadas por ELISA. Resultado em média e erro padrão de dois experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparados ao grupo AIC e PBS.

6.5- Tratamento com lipossomos contendo controla a inflamação tecidual

As análises histológicas (figura 23) revelam alterações na estrutura da articulação das patas dos camundongos com AIC. Na figura 23a é possível observar como a estrutura das patas dos animais saudáveis se apresenta íntegra sem nenhum tipo de proliferação tecidual e degradação do tecido. Nas figuras 23b e 23c, articulações tratadas com PBS e PC, respectivamente, é possível observar como a inflamação se mantém de forma difusa pelo tecido, a presença de *pannus*, e degradação tecidual. A inflamação observada nessas imagens ocorre de forma moderada a severa, porém a inflamação é difusa por todo o tecido. A figura 23d, que corresponde ao tratamento com lipossomos contendo PS, também apresenta a inflamação indicada pela presença da proliferação celular, porém essa inflamação ocorre de forma centrada, ao contrário dos outros grupos doentes. Ademais, a inflamação se caracteriza por ser leve e moderada.

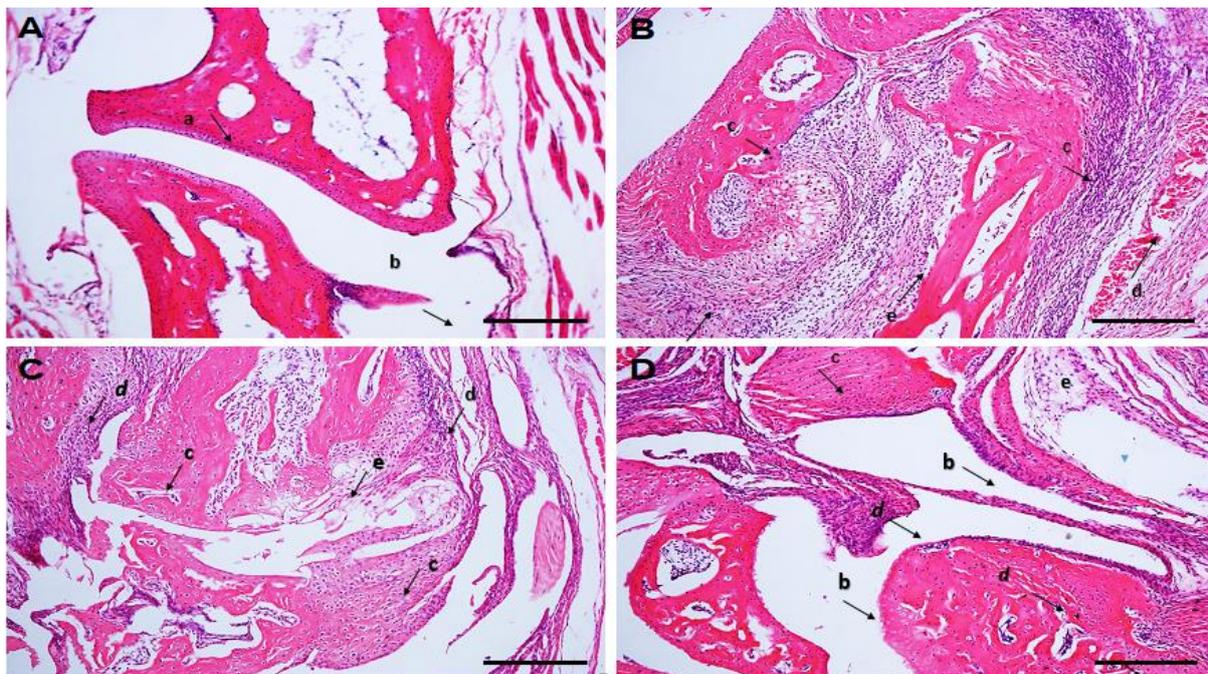


Figura 23- Histopatologia das articulações de camundongos com AIC tratados ou não. Animais DBA1 foram imunizados com colágeno bovino para indução de AIC. Após 28 dias da imunização os animais foram tratados intraperitonealmente com PBS ou lipossomos contendo PC ou PS, 3 vezes por semana durante 3 semanas. Após o período de tratamento os animais foram sacrificados e as patas foram coletadas, processadas para histologia, cortes de 3 μ m foram corados em Hematoxilina e Eosina. **(A) animais saudáveis, (B) animais tratados com PBS, (C) animais tratados com PC e (D) animais tratados com PS.** Barra = 100 μ m. **Legenda das estruturas: (a)-osso, (b) cartilagem, (c) hiperplasia óssea, (d) pannus, (e) infiltrado celular.**

Com base nos resultados obtidos através da histologia, foram realizadas análises de parâmetros histológicos com a finalidade de quantificar o grau de acometimento (Figura 24), inflamação e degradação tecidual. Tanto o grupo de animais tratados com lipossomos contendo PC quanto contendo PS apresentaram um escore menor de presença de *pannus*, e também um escore menor no nível do infiltrado inflamatório (Figura 24). No entanto o infiltrado inflamatório no grupo tratado com lipossomos contendo PC, embora menos extenso que no grupo controle, se apresentou de forma difusa.

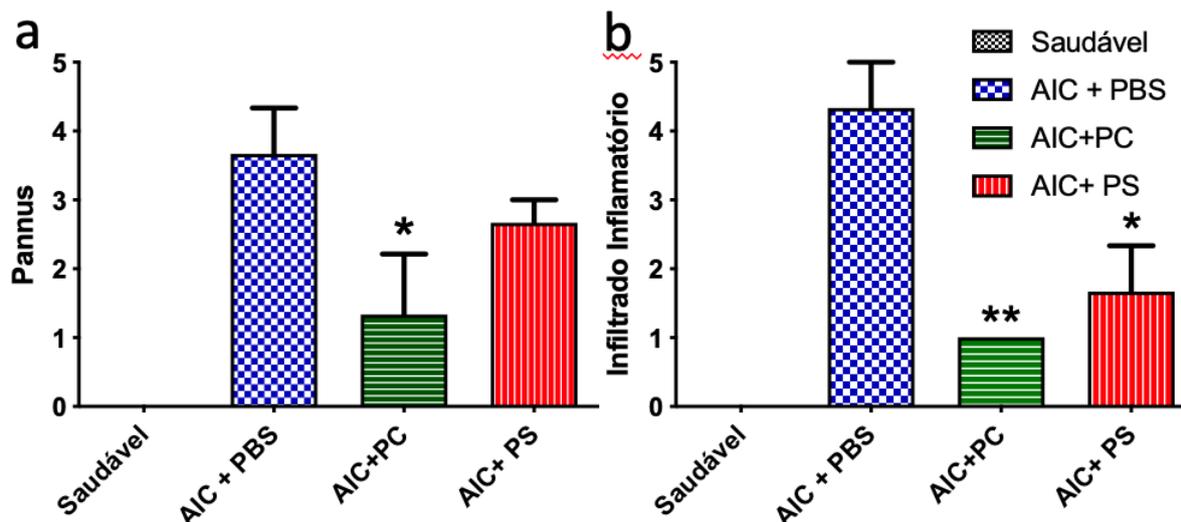


Figura 24- Análise das alterações histológicas da pata de camundongos DBA/1 no modelo de AIC. Dados foram compilados através da análise histológica das imagens obtidas. Foi determinado um escore de 0 a 6, no qual 0 corresponde a menor gravidade e 5 maior gravidade. (a) Tecido inflamatório ou *pannus*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo AIC+PBS; (b) Infiltrado inflamatório. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado ao grupo AIC + PBS. Resultado em média e erro padrão de dois experimentos.

7- Discussão

A AR é uma doença autoimune inflamatória crônica caracterizada pela hiperplasia de células na membrana sinovial das articulações, além de edema e dor nas articulações. A progressão da doença resulta na perda de tecido ósseo e consequentemente perda da função afetando a qualidade de vida do paciente (LEE; WEINBLATT, 2001). Os tratamentos atuais para artrite envolvem esteroides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e DMARDs, como os anticorpos neutralizantes anti-TNF- α , porém esses medicamentos possuem efeitos colaterais graves (ABBASI et al., 2019)(LEE; WEINBLATT, 2001). Dessa forma, existe a necessidade de que outras terapias possam ser desenvolvidas e utilizadas para reduzir a progressão da doença. Aqui, testamos o controle da inflamação causada em AIC utilizando tratamento com lipossomos contendo PS. A hipótese foi que esses lipossomos mimetizam o processo anti-inflamatório da apoptose quando são reconhecidos por células fagocíticas ocorrendo a liberação de citocinas imunossupressoras como TGF- β (MA; WU; NAKANISHI, 2011). O aumento dessas citocinas diminuiu os efeitos pró inflamatórios que outras citocinas causam como ativação de fibroblastos, recrutamento de células inatas como macrófagos, ativação de linfócitos T autoimunes e ativação de osteoclastos.

Demonstramos que no modelo AIC a resposta inflamatória pode ser modulada pelo tratamento com lipossomos contendo PS, causando efeitos benéficos nos animais como a proteção ao dano tecidual, dor mecânica, mobilidade e produção de citocinas inflamatórias (Figuras 17, 19, 20-22). No entanto, durante o período de avaliação das manifestações clínicas diferença significativas não foram detectadas no desenvolvimento de edema e eritema articular e não houve diferença na perda de peso dos animais. Isso pode ser explicado pelo tratamento que foi iniciado com a doença já em curso e, embora alguns parâmetros tenham sido modulados negativamente, não houve reversão completa do dano articular (Figura 21). Outros trabalhos que utilizam o modelo AIC também não demonstram remissão total da doença com seus tratamentos. Nesses trabalhos também se levou em consideração como parâmetros de avaliação clínica edema e eritema (LIU; XIAO, 2020) (HUI et al., 2019). Esses dados apresentados pelos trabalhos citados acima sugerem que o tempo para que ocorra a reversão completa do dano articular, edema e eritema causado pelo exsudado inflamatório pode não ser suficiente, indicando que a avaliação deve ser feita em tempos mais tardios. Vale ressaltar que o modelo de AIC é um modelo agudo de uma doença caracterizada pelo acometimento crônico. Desse modo, o dano observado foi bem extenso, tanto no que diz respeito ao dano na cartilagem quanto na erosão óssea (Figura 21).

A dor pode ser compreendida, segundo a *International Association for the Study of Pain*, como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2021). Há uma diferença entre dor e nocicepção, o primeiro se refere a manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos, enquanto que o segundo se refere a percepção de um estímulo doloroso o que requer a elaboração de impulsos sensoriais (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Como a dor é uma das principais características na AR e causa consequências relacionadas a função das articulações, perda de mobilidade e morbidade associada a doença, alguns testes foram realizados para avaliarmos a alodinia dos animais AIC ao decorrer do tratamento. Os experimentos utilizando filamentos de Von Frey indicaram que o tratamento foi efetivo ao diminuir o limiar de nocicepção dos animais tratados com PS (Figura 19). Isso sugere que o tratamento pode contribuir inibindo a alodinia por estímulo mecânico na nocicepção periférica. Este resultado sugere que os animais tratados com lipossomos contendo PS apresentam melhora no escore de mobilidade, pois apresentam mais

facilidade de locomoção (Figura 17). Nós entendemos que, como a inflamação está localizada no tecido articular, os lipossomos contendo PS administrados de forma sistêmica, chegam nessa região através do extravasamento do plasma causado pela inflamação e aumento da permeabilidade vascular local. Então estes lipossomos são reconhecidos por células residentes e por células infiltrantes, modulando o perfil de citocinas produzidas nessa região. Esta possibilidade precisa ser avaliada, através de quantificação do perfil de citocinas produzidas nas articulações. No entanto, é razoável sugerir que pode ocorrer a diminuição de citocinas inflamatórias que possuem como característica aumentar a dor inflamatória.

A dor inflamatória acontece pela ativação de neurônios nociceptivos sensoriais primários (TOMINAGA et al., 2003). A resposta inflamatória desencadeia a vasodilatação, recrutamento de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ e PGF₂) e citocinas. Atualmente sabe-se que o principal mediador que causa dor inflamatória são as prostaglandinas, porém os estímulos inflamatórios iniciam uma cascata de citocinas e quimiocinas que precedem as prostaglandinas. As principais citocinas que já foram descritas que participam do processo de hiperalgesia são IL-1 β , TNF- α , IL-6 e as quimiocinas IL-8, induzidas por quimiocinas neutrófilos quimioatraente-1 (CINC-1) e derivados de queratinócitos quimiocina (KC) (VERRI et al., 2006). Nossos resultados mostram que o tratamento com lipossomos contendo PS diminuiu os níveis séricos de TNF- α , o que sugere que a hipótese de modulação da dor inflamatória é consistente. No entanto, o teste de hiperalgesia térmica não indicou diferença na regulação de nocicepção central entre os grupos saudáveis e AIC, o que sugere que o tipo de estímulo térmico esteja acima do limiar de dor nesse modelo animal.

As citocinas que escolhemos dosar foram a IL-17 e a TNF- α . A IL-17 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ Th17 e é protetora contra patógenos intracelulares e extracelulares, além disso a sua presença tem um papel crítico em várias doenças inflamatórias autoimunes. Na AR a destruição da cartilagem e do tecido ósseo envolve a presença de IL-17 nas articulações, pois esta citocina estimula os osteoblastos a expressarem RANK-L, induzindo a diferenciação de osteoclastos a partir de monócitos e macrófagos. Este processo é central na erosão óssea e formação do *pannus* (KUWABARA et al., 2017). O TNF α é uma citocina inicial na inflamação, produzida por macrófagos e auxilia no combate a infecções (CUI et al., 2018). Porém, a produção exacerbada pode causar doenças autoimunes como a AR,

pois ativa a produção de fatores inflamatórios, atrai monócitos inflamatórios e estimula condrócitos e SSF a liberarem MMPS e iniciar o dano a cartilagem (DENG et al., 2020) (HUSBY; WILLIAMS, 1988). Já foi demonstrado que o TNF α participa ativamente do desenvolvimento de artrite, pois camundongos transgênicos que superexpressam essa citocina desenvolveram artrite espontaneamente (KEFFER et al., 1991). Além disso, a utilização de anticorpos neutralizantes anti-TNF α controlam a doença (HUSBY; WILLIAMS, 1988). O grupo de animais tratados com lipossomos contendo PS apresentou menor quantidade de TNF- α sérico, enquanto não houve diferença em relação a IL-17 (Figura 20). Este resultado sugere que a ação dos lipossomos contendo PS é anti-inflamatória e não modula a resposta adaptativa autoimune. Trabalhos anteriores mostram que o reconhecimento de PS induz a secreção de TGF β por células fagocíticas (Huynh *et al.*, 2002). Este processo precisa ser avaliado especificamente em nosso modelo, mas pode estar acontecendo na articulação, causando um efeito anti-inflamatório nas células produtoras de TNF α como macrófagos, sinoviócitos e osteoclastos. No entanto, esta citocina tem efeitos imunogênicos, principalmente na indução da diferenciação de linfócitos Th17. Estas células necessitam ser estimuladas por TGF β e IL-6 para se desenvolverem e a IL-6 é encontrada em grande quantidade na articulação afetada (Avci *et al.*, 2018). Desse modo, os efeitos do tratamento com lipossomos contendo PS podem não afetar a ação efetora de linfócitos Th17 na AIC, o que explica a ausência de diferenças na quantificação desta citocina entre grupos de animais.

Os cortes histológicos das patas dos camundongos confirmaram o processo inflamatório articular típico da AIC. Na imagem do grupo saudável é possível observar a integridade do tecido e a ausência de *pannus* e inflamação (Figura 22). As articulações dos animais tratados com lipossomos contendo PS apresentaram diminuição significativa do infiltrado inflamatório e no *pannus* confirmando que o tratamento tem ação anti-inflamatória. Como um dos principais problemas da AR é destruição tecidual (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016), conseguir diminuir a inflamação no tecido contribui significativamente para minimizar os danos a perda funcional articular. Não observamos diferenças histopatológicas significativas referentes a regressão do dano ósseo e da cartilagem como fissuras verticais, erosão de camadas calcificada e na coloração com safranina. Acreditamos que, como o dano

já é bem extenso nos animais no momento do início do tratamento, o tempo de 21 dias é insuficiente para observar recomposição significativa do tecido.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que o tratamento com lipossomos contendo PS tiveram ação anti-inflamatória contribuindo com a redução de dor mecânica, reduzindo $TNF\alpha$ e diminuindo inflamação das articulações. Não foram testadas outras doses ou vias de administração de lipossomos contendo PS nesse estudo, o que deixa margem para otimizar o protocolo de tratamento. Também é necessário dosar outras citocinas no soro e nas articulações que participam da imunopatogênese da AIC como a IL-6 e IL-1b, além de dosar citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e o $TGF-\beta$.

8- Conclusão

Nossos dados mostram que o tratamento de camundongos com AIC com lipossomos contendo os induz atividade anti-inflamatória contribuindo ativamente com a diminuição de sensibilidade a dor permitindo melhor atividade funcional das articulações, o que pode ser observado na avaliação da capacidade locomotora dos animais. Este resultado indica que o tratamento diminui significativamente a inflamação articular e produção de $TNF\alpha$. Esperamos que novos trabalhos possam ser desenvolvidos a partir dessas observações, explorando de forma mais aprofundada a possibilidade do uso de partículas recobertas com PS como tratamento anti-inflamatório adjuvante em doenças crônicas inflamatórias.

7- Referências

- ABBASI, M. ET AL. **Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old & the new**, *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), pp. 10018–10031. doi: 10.1002/jcp.27860, (2019).
- ABTAHI, S. ET AL. **‘Concomitant use of oral glucocorticoids & proton pump inhibitors & risk of osteoporotic fractures among patients with rheumatoid arthritis: A population-based cohort study’**, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 80(4), pp. 423–431. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218758. (2021).
- ALMEIDA, T. F., Roizenblatt, S. & Tufik, S. **Afferent pain pathways: A neuroanatomical review**, *Brain Research*, 1000(1–2), pp. 40–56. doi: 10.1016/j.brainres.2003.10.073. (2004)
- APANASKEVICH, D. ET AL. **The Journal of the American Society of Parasitologists**, *Journal of Parasitology*, 97(3), pp. 389–398. doi: DOI: 10.1645/GE-2366.1. (2011)
- ATSUMI, T. ET AL. **A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis**, *Journal of Experimental Medicine*, 196(7), pp. 979–990. doi: 10.1084/jem.20020619, (2002).
- AVCI, A. B., FEIST, E. & BURMESTER, G. R. **Targeting IL-6 or IL-6 Receptor in Rheumatoid Arthritis: What’s the Difference?** *BioDrugs*. Springer International Publishing, (0123456789). doi: 10.1007/s40259-018-0320-3, (2018).
- BADSHA, H., HARIFI, G. & MURRELL, W. D. **Platelet Rich Plasma for Treatment of Rheumatoid Arthritis: Case Series & Review of Literature**, *Case Reports in Rheumatology*, 2020, pp. 1–7. doi: 10.1155/2020/8761485, (2020).
- BAX, M. ET AL. **Genetics of rheumatoid arthritis: What have we learned?** *Immunogenetics*, 63(8), pp. 459–466. doi: 10.1007/s00251-011-0528-6, (2011).
- BIRGE, R. B. ET AL. **Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, & cancer**. *Nature Publishing Group*, 23(6), pp. 962–978. doi: 10.1038/cdd.2016.11, (2016).
- BLAIR, H. A. & DEEKS, E. D. **Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis**, *Drugs*. Springer International Publishing, 77(11), pp. 1221–1233. doi: 10.1007/s40265-017-0775-4, (2017).
- BOISSIER, M. C. **Cell & cytokine imbalances in rheumatoid synovitis**, *Joint Bone Spine*. Elsevier Masson SAS, 78(3), pp. 230–234. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.08.017. (2011).
- BOISSIER, M. C. ET AL. **Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis & joint destruction**, *Journal of Autoimmunity*, 39(3), pp. 222–228. doi: 10.1016/j.jaut.2012.05.021, (2012).
- BRAND, D. D., KANG, A. H. & ROSLONIEC, E. F. **Immunopathogenesis of Collagen Arthritis**, pp. 3–18. doi: 10.1007/s00281-003-0127-1, (2003).

- BRAND, D. D., LATHAM, K. A. & ROSLONIEC, E. F. **Collagen-induced arthritis**, *Nature Protocols*, 2(5), pp. 1269–1275. doi: 10.1038/nprot.2007.173, (2007).
- BRUNE, K. & PATRIGNANI, P. **New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs**, *Journal of Pain Research*, 8, pp. 105–118. doi: 10.2147/JPR.S75160, (2015).
- BURMESTER, G. R. ET AL. **Adalimumab: Long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis & Crohn's disease**, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(4), pp. 517–524. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-201244, (2013).
- Bustamante, M. F. et al. **Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis**, *Arthritis Research & Therapy*. *Arthritis Research & Therapy*, 19(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13075-017-1303-3, (2017).
- CAPLAZI, P. ET AL. **Mouse Models of Rheumatoid Arthritis**, 52(5), pp. 819–826. doi: 10.1177/0300985815588612, (2015).
- CELLS, C. B. T. ET AL. **Effector Function of Type II Collagen – Stimulated T Cells From Rheumatoid Arthritis Patients**, 50(3), pp. 776–784. doi: 10.1002/art.20106, (2004).
- CHAO, M. P., MAJETI, R. & WEISSMAN, I. L. **Programmed cell removal: A new obstacle in the road to developing cancer**, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 58–67. doi: 10.1038/nrc3171(2012).
- CHARLES, P. ET AL. **Regulação de citocinas, inibidores de citocinas e proteínas de fase aguda após terapia anti-TNF- α na artrite reumatóide**, (15), pp. 1–20, (2021).
- CHEN, W. J. ET AL. **Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3**, *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp. 1875–1886. doi: 10.1084/jem.20030152, (2003)
- CHO, M. ET AL. **IL-17 induces the production of IL-16 in rheumatoid arthritis**, 40(2), pp. 237–245, (2008).
- CHOUHARY, N., BHATT, L. K. & PRABHAVALKAR, K. S. **Experimental animal models for rheumatoid arthritis**, *Immunopharmacology & Immunotoxicology*. Informa Healthcare USA, Inc, 0(0), pp. 1–8. doi: 10.1080/08923973.2018.1434793, (2018).
- CHUANG, S. Y. ET AL. **Lipid-Based nanoparticles as a potential delivery approach in the treatment of rheumatoid arthritis**, *Nanomaterials*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.3390/nano8010042, (2018).
- CILDAG, S. & SENTURK, T. **Sulfasalazine-related hypersensitivity reactions in patients with rheumatic diseases**, *Journal of Clinical Rheumatology*, 23(2), pp. 77–79. doi: 10.1097/RHU.0000000000000490, (2017).
- CODIVILLA, R. ET AL. **Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts 1**. doi: 10.1016/j.joca.2005.10.004, (2006).
- COOPER, C., COUPLAND, C. & MITCHELL, M. **Rheumatoid arthritis**,

- corticosteroid therapy & hip fracture**, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54(1), pp. 49–52. doi: 10.1136/ard.54.1.49, (1995).
- CROFFORD, L. J. **Use of NSAIDs in treating patients with arthritis**, *Arthritis Research & Therapy*, 15(SUPPL 3). doi: 10.1186/ar4174, (2013).
- CUI, X. ET AL. **Trivalent soluble TNF Receptor, a potent TNF α antagonist for the treatment collagen-induced arthritis**, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-25652-w, (2018).
- DENG, H. ET AL. **Cytokine Effects of daphnetin on the autophagy signaling pathway of fibroblast-like synoviocytes in rats with collagen-induced arthritis (AIC) induced by TNF- α** , *Cytokine*. Elsevier, 127, p. 154952. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154952, (2020).
- DERKSEN, V. F. A. M., HUIZINGA, T. W. J. & VAN DER WOUDE, D. **The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis**, *Seminars in Immunopathology*. *Seminars in Immunopathology*, 39(4), pp. 437–446. doi: 10.1007/s00281-017-0627-z, (2017).
- DEUIS, J. R., DVORAKOVA, L. S. & VETTER, I. **Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents**, 10(September), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284, (2017).
- DHILLON, S. **Intravenous tocilizumab: A review of its use in adults with rheumatoid arthritis**, *BioDrugs*, 28(1), pp. 75–106. doi: 10.1007/s40259-013-0076-8, (2014).
- DIANE E. HandY RITA CASTRO JOSEPH LOSCALZO **Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA**, *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/nrrheum.2012.190.Duality, (2011).
- DUBIN, A. E. & PATAPOUTIAN, A. **Nociceptors: The sensors of the pain pathway**, *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843, (2010).
- FAICH, G. ET AL. **Gastrointestinal Toxicity With Celecoxib vs, JAMA: the journal of the American Medical Association**, 284(10), pp. 1247–1255, (2000).
- FARR, M. ET AL. **The long term effects of sulphasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis & a comparative study with penicillamine**, *Clinical Rheumatology*, 3(4), pp. 473–481. doi: 10.1007/BF02031270, (1984).
- FIRESTEIN, G. S. & MCINNES, I. B. **Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis**, *Immunity*, 46(2), pp. 183–196. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006, (2017).
- GILBREATH, M. J. ET AL. **Differential inhibition of macrophage microbicidal activity by liposomes**, *Infection & Immunity*, 47(2), pp. 567–569. doi: 10.1128/iai.47.2.567-569.1985, (1985).
- GILLESPIE, M. T. **Impact of cytokines & T lymphocytes upon osteoclast differentiation & function**, *Arthritis Research & Therapy*, 9(2), pp. 7–9. doi: 10.1186/ar2141, (2007).
- GLASSON, S. S. ET AL. **The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse**, *Osteoarthritis & Cartilage*. Elsevier Ltd, 18(SUPPL. 3), pp. S17–S23.

- doi: 10.1016/j.joca.2010.05.025, (2010).
- HAIKAL, S. M. ET AL. **Combination Therapy of Mesenchymal Stromal Cells & Interleukin-4 Attenuates Rheumatoid Arthritis in a Collagen-Induced Murine Model**, (2019).
- HAREL-ADAR, T. ET AL. **Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), pp. 1827–1832. doi: 10.1073/pnas.1015623108, (2011).
- HARRE, U. ET AL. **Induction of osteoclastogenesis & bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin**, *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp. 1791–1802. doi: 10.1172/JCI60975, (2012).
- HOSPITAL, K. O. **IL-8 / NAP-1 Is the Major T-Cell Chemoattractant in Synovial Tissues of Rheumatoid Arthritis** 1, 80(2), pp. 179–184, (1996).
- HUA, C., BUTTGEREIT, F. & COMBE, B. **Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: Current status & future studies**, *RMD Open*, 6(1), pp. 1–9. doi: 10.1136/rmdopen-2017-000536, (2020).
- HUI, W. ET AL. **Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis**, *International Immunopharmacology*. Elsevier, 68(January), pp. 226–233. doi: 10.1016/j.intimp.2019.01.018, (2019).
- HUSBY, G. & WILLIAMS, R. C. **Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis**, *Journal of Autoimmunity*, 1(4), pp. 363–371. doi: 10.1016/0896-8411(88)90006-6, (1988).
- HUYNH, M. L. N., FADOK, V. A. & HENSON, P. M. **Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion & the resolution of inflammation**, *Journal of Clinical Investigation*, 109(1), pp. 41–50. doi: 10.1172/JCI0211638, (2002).
- KEFFER, J. ET AL. **Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis**, *EMBO Journal*, 10(13), pp. 4025–4031. doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04978.x, (1991).
- KLEINERMAN, E. S. ET AL. **Tumoricidal activity of human monocytes activated in vitro by free & liposome-encapsulated human lymphokines**, *Journal of Clinical Investigation*, 72(1), pp. 304–315. doi: 10.1172/JCI110970, (1983).
- KOMATSU, N. & TAKAYANAGI, H. **Inflammation & bone destruction in arthritis: Synergistic activity of immune & mesenchymal cells in joints**, *Frontiers in Immunology*, 3(APR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2012.00077, (2012).
- KONISTI, S., KIRIAKIDIS, S. & PALEOLOG, E. M. **Angiogenesis in rheumatoid arthritis**, *Angiogenesis & Vascularisation: Cellular & Molecular Mechanisms in Health & Diseases*, 42(7), pp. 339–365. doi: 10.1007/978-3-7091-1428-5_16, (2013).
- KOTYLA, P. J. **Are Janus Kinase Inhibitors Superior over Classic Biologic Agents in RA Patients?** *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/7492904, (2018)

- KUCHROO, V. K. ET AL. **in Immune Regulation**, (July), pp. 1–4, (2003).
- Kuwabara, T. et al. **The Role of IL-17 & Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases**, *Mediators of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation, 2017. doi: 10.1155/2017/3908061, (2017).
- Kyburz, D., Brentano, F. & Gay, S. **Mode of action of hydroxychloroquine in RA - Evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling**, *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(9), pp. 458–459. doi: 10.1038/ncprheum0292, (2006).
- LEE, D. M. & WEINBLATT, M. E. **Referinta 6**, 358, pp. 903–911, (2001).
- LEE, J. ET AL. **A scaffold for signaling of Tim-4-mediated efferocytosis is formed by fibronectin**, *Cell Death & Differentiation*. Springer US, 26(9), pp. 1646–1655. doi: 10.1038/s41418-018-0238-9, (2019).
- LIMA, L. G. ET AL. **Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner**, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 283(2), pp. 168–175. doi: 10.1016/j.canlet.2009.03.041, (2009).
- LIN, Y. J., ANZAGHE, M. & SCHÜLKE, S. **Update on the Pathomechanism, Diagnosis, & Treatment Options for Rheumatoid Arthritis**, *Cells*, 9(4). doi: 10.3390/cells9040880, (2020).
- LITTLEJOHN, E. A. & MONRAD, S. U. **Early Diagnosis & Treatment of Rheumatoid Arthritis**, *Primary Care - Clinics in Office Practice*. Elsevier Inc, 45(2), pp. 237–255. doi: 10.1016/j.pop.2018.02.010, (2018).
- LIU, H. & XIAO, C. **Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells Display Therapeutic Potential in Rheumatoid Arthritis by Regulating Interactions Between Immunity & Gut Microbiota via the Aryl Hydrocarbon Receptor**, 8(March), pp. 1–19. doi: 10.3389/fcell.2020.00131, (2020).
- LORENZETTI, R. ET AL. **Abatacept modulates CD80 & CD86 expression & memory formation in human B-cells**, *Journal of Autoimmunity*. Elsevier, 101(May), pp. 145–152. doi: 10.1016/j.jaut.2019.04.016, (2019).
- MA, H. M., WU, Z. & NAKANISHI, H. **Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophage**, *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 91(6), pp. 921–931. doi: 10.1038/labinvest.2011.54, (2011).
- MCINNES, I. B. & SCHETT, G. **Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis**, *New England Journal of Medicine*, 365(23), pp. 2205–2219. (2011)
- MCKENNA, M. R., STOBAUGH, D. J. & DEEPAK, P. **Melanoma & non-Melanoma Skin Cancer in Inflammatory Bowel Disease Patients following Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor Monotherapy & in Combination with Thiopurines: Analysis of the Food & Drug Administration Adverse Event Reporting System**, *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, 23(3), pp. 267–271. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.233.mrmk, (2014).
- MCNAMEE, K., WILLIAMS, R. & SEED, M. **Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they?** *European Journal of Pharmacology*.

- Elsevier, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.047, (2015).
- MELLADO, M. ET AL. **T cell migration in rheumatoid arthritis**, *Frontiers in Immunology*, 6(JUL). doi: 10.3389/fimmu.2015.00384, (2015).
- MENSE, S. **Basic neurobiologic mechanisms of pain & analgesia**, *The American Journal of Medicine*, 75(5 PART 1), pp. 4–14. doi: 10.1016/0002-9343(83)90226-7, (1983).
- NAEINI, M. B. ET AL. **The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions**, *Cellular & Molecular Biology Letters*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 25(1). doi: 10.1186/s11658-020-00214-z, (2020).
- NAKANO, T. ET AL. **Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6**, *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), pp. 29411–29414. doi: 10.1074/jbc.272.47.29411, (1997).
- OAKLEY, R. H., BUSILLO, J. M. & CIDLOWSKI, J. A. **Cross-talk between the glucocorticoid receptor & MyoD family inhibitor domain-containing protein provides a new mechanism for generating tissue-specific responses to glucocorticoids**, *Journal of Biological Chemistry*, 292(14), pp. 5825–5844. doi: 10.1074/jbc.M116.758888, (2017).
- OKADA, H. ET AL. **CTLA4-Ig Directly Inhibits Osteoclastogenesis by Interfering With Intracellular Calcium Oscillations in Bone Marrow Macrophages**, *Journal of Bone & Mineral Research*, 34(9), pp. 1744–1752. doi: 10.1002/jbmr.3754, (2019).
- OTTONELLO, L. ET AL. **Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine & proinflammatory cytokines**, pp. 1249–1260, (2002).
- OZEN, G. ET AL. **Safety of abatacept compared with other biologic & conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: Data from an observational study**, *Arthritis Research & Therapy*. *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13075-019-1921-z, (2019).
- PECK, A. & MELLINS, E. D. **Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis**, *NIH Public Access*, 132(3), pp. 295–304. doi: 10.1016/j.clim.2009.03.522.Breaking, (2009).
- POLLASTRO, S. ET AL. **Non-response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis is associated with incomplete disruption of the B cell receptor repertoire**, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(10), pp. 1339–1345. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214898, (2019).
- PRIMATE, B. & DISEASES, A. **Prophylactic & therapeutic effects of a humanized monoclonal antibody against the IL-2 receptor (DACLIZUMAB) on collagen-induced arthritis (AIC) in rhesus monkeys**, pp. 134–141, (2001).
- PUJOL-AUTONELL, I. ET AL. **Use of Autoantigen-Loaded Phosphatidylserine-Liposomes to Arrest Autoimmunity in Type 1 Diabetes**, *PLOS ONE*. Edited by M. S. Horwitz. Public Library of Science, 10(6), p. e0127057. doi: 10.1371/journal.pone.0127057, (2015). RAJA, S. N.

- ET AL. **The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, & compromises**, *Compromises*, 161(9), pp. 1976–1982. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939. (2021).
- RAJAGOPALAN, P. T. R. ET AL. **Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble & single-molecule kinetics**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), pp. 13481–13486. doi: 10.1073/pnas.172501499, (2002).
- RAMWADHDOEBE, T. H. ET AL. **Effect of rituximab treatment on T & B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis**, *Rheumatology (United Kingdom)*, 58(6), pp. 1075–1085. doi: 10.1093/rheumatology/key428, (2019).
- ROBERTS, R. A. ET AL. **Towards programming immune tolerance through geometric manipulation of phosphatidylserine**, *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 72, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.040, (2015).
- RODRIGUEZ-FERNANDEZ, S. ET AL. **Phosphatidylserine-liposomes promote tolerogenic features on dendritic cells in human type 1 diabetes by apoptotic mimicry**, *Frontiers in Immunology*, 9(FEB). doi: 10.3389/fimmu.2018.00253, (2018).
- SAKAGUCHI, S. ET AL. **FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system**, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(7), pp. 490–500. doi: 10.1038/nri2785, (2010).
- SASAI, M. ET AL. **Delayed onset & reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice**, *Arthritis & Rheumatism*, 42(8), pp. 1635–1643. doi: 10.1002/1529-0131(199908)42:8<1635:AID-ANR11>3.0.CO;2-Q, (1999).
- SAVILL, J. ET AL. **A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses**, *Nature Reviews Immunology*, 2(12), pp. 965–975. doi: 10.1038/nri957, (2002).
- SEGAWA, K. & NAGATA, S. **An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure**, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 25(11), pp. 639–650. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003, (2015).
- SHAN, S. ET AL. **Therapeutic treatment of a novel selective JAK3/JAK1/TBK1 inhibitor, CS12192, in rat & mouse models of rheumatoid arthritis**, *International Immunopharmacology*. Elsevier, 77(April), p. 105914. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105914, (2019).
- SHI, D. ET AL. **Artificial phosphatidylserine liposome mimics apoptotic cells in inhibiting maturation & immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells in response to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in vitro**, *Archives of Dermatological Research*, 299(7), pp. 327–336. doi: 10.1007/s00403-007-0770-9, (2007).
- SHIM, J. HYUCK, STAVRE, Z. & GRAVALLESE, E. M. **Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms & Clinical Implications**, *Calcified Tissue International*. Springer US, 102(5), pp. 533–546. doi: 10.1007/s00223-017-0373-1, (2018).
- SHIN, S.-A. ET AL. **Apoptotic cell clearance in the tumor microenvironment:**

- a potential cancer therapeutic target**, Archives of Pharmacal Research. Pharmaceutical Society of Korea. doi: 10.1007/s12272-019-01169-2, (2019).
- Shinjo, S. K. et al. **Chloroquine-induced bull's eye maculopathy in rheumatoid arthritis: Related to disease duration?** Clinical Rheumatology, 26(8), pp. 1248–1253. doi: 10.1007/s10067-006-0478-9, (2007).
- SMOLEN, J. S. & ALETAHA, D. **Invited Seminar: Rheumatoid Arthritis**, Lancet Manuscript Rheumatoid Arthritis, 388(March), pp. 1–28, (2017).
- SMOLEN, J. S., ALETAHA, D. & MCINNES, I. B. **Rheumatoid arthritis**, The Lancet. Elsevier Ltd, 388(10055), pp. 2023–2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8, (2016).
- SOKOLOVE, J. ET AL. **Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis**, PLoS ONE, 7(5), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0035296, (2012).
- STANFORD, J. C. ET AL. **Efferocytosis produces a prometastatic landscape during postpartum mammary gland involution**, Journal of Clinical Investigation, 124(11), pp. 4737–4752. doi: 10.1172/JCI76375, (2014).
- TODA, S. ET AL. **Clearance of Apoptotic Cells & Pyrenocytes. 1st edn, Current Topics in Developmental Biology**. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.017, (2015).
- TOMINAGA, M. ET AL. **Molecular mechanisms of nociception', Japanese Journal of Neuropsychopharmacology**, 23(3), pp. 139–147. doi: 10.1201/b14255-2, (2003).
- VERRI, W. A. ET AL. **Hypernociceptive role of cytokines & chemokines: Targets for analgesic drug development?** Pharmacology & Therapeutics, 112(1), pp. 116–138. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.001, (2006).
- VINCENT, T. L. ET AL. **Review Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models**, (March), pp. 1931–1941. doi: 10.1093/rheumatology/kes035, (2012).
- WEGNER N ET AL. **Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen & α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis**. Arthritis Rheum; 62(9): 2662-2672.', 62(9), pp. 2662–2672. doi: 10.1002/art.27552. Peptidylarginine, (2011).
- WEISSMANN, G. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis**, Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases, 64(1–2), pp. 12–15, (2006).
- WIUM M, PACCEZ JD, ZERBINI LF. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases & Cancer: An Overview. *Cells*. 2018; 7(10):166.
- ZECHNER, E. L. **Inflammatory disease caused by intestinal pathobionts**, Current Opinion in Microbiology. Elsevier Ltd, 35, pp. 64–69. doi: 10.1016/j.mib.2017.01.011, (2017).